



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA**

**NÚCLEO DE SAÚDE**

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EXPERIMENTAL**

**IASMIN FERREIRA PIMENTEL**

**INFECÇÃO NATURAL POR *Plasmodium vivax* E *Plasmodium falciparum* EM *Anopheles* spp. (Diptera: Culicidae) CAPTURADOS NAS ÁREAS DE INFLUÊNCIA DIRETA DA USINA HIDRELÉTRICA DE JIRAU EM RONDÔNIA**

**PORTO VELHO/RO**

**2014**

IASMIN FERREIRA PIMENTEL

INFECÇÃO NATURAL POR *Plasmodium vivax* E *Plasmodium falciparum* EM *Anopheles* spp. (Diptera: Culicidae) CAPTURADOS NAS ÁREAS DE INFLUÊNCIA DIRETA DA USINA HIDRELÉTRICA DE JIRAU EM RONDÔNIA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental da Universidade Federal de Rondônia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Experimental.

Orientador: Dr. Ricardo de Godoi Mattos Ferreira

PORTO VELHO/RO

2014

## FICHA CATALOGRÁFICA

### BIBLIOTECA PROF. ROBERTO DUARTE PIRES

P644i

Pimentel, Iasmin Ferreira

Infecção natural por *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum* em *Anopheles* spp. (Diptera: Culicidae) capturados nas áreas de influência direta da Usina Hidrelétrica de Jirau em Rondônia/Iasmin Ferreira Pimentel. Porto Velho, Rondônia: 2014.

61f

Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental) – Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Godoi Mattos Ferreira

1. *Anopheles*. 2. *Plasmodium*. 3. PCR. 4. Monitoramento.  
I. Ferreira, Ricardo de Godoi Mattos. II. Título.

CDU: 573: 616.936

Bibliotecária Responsável: Cristiane Marina T. Girard CRB11/897

IASMIN FERREIRA PIMENTEL

INFECÇÃO NATURAL POR *Plasmodium vivax* E *Plasmodium falciparum* EM *Anopheles* spp. (Diptera: Culicidae) CAPTURADOS NAS ÁREAS DE INFLUÊNCIA DIRETA DA USINA HIDRELÉTRICA DE JIRAU EM RONDÔNIA

**BANCA EXAMINADORA:**

**Dr<sup>a</sup>. Genimar Rebouças Julião**

Pesquisadora – FIOCRUZ Rondônia

**Dr. Jansen Fernandes de Medeiros**

Pesquisador – FIOCRUZ Rondônia

**Dr<sup>a</sup>. Máisa da Silva Araújo**

Pesquisadora – FIOCRUZ Rondônia

**SUPLENTE**

**Dr. Ricardo de Godoi Mattos Ferreira**

Orientador – FIOCRUZ Rondônia

**Dr<sup>a</sup> Maria Aurea Silveira**

Pesquisadora – UNIR

**Defesa de dissertação em 05 de maio de 2014**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Ricardo de Godoi, pela orientação, apoio e amizade.

À equipe do laboratório de Entomologia do IPEPATRO e FIOCRUZ Rondônia, que realizou as capturas e triagem das amostras deste trabalho.

Ao ‘maridão’ Andonai, pelo incentivo, amor e compreensão.

Aos meus pais, pelo incentivo e carinho.

Aos colegas do laboratório de Genética/Engenharia de Anticorpos, Lilian, Kátia, Hélien, Nidi, Michelinha, Soraya (e Pedrinho), Paula, Michele Pereira, Marcos, Naã, Marcela e Andreisse, pelo apoio e companheirismo na hora do estudo e do café da manhã.

Aos colegas do laboratório de Entomologia, Frances, Moreno, Elis, Wanne, Luiz, Alexandre e Maísa, pela convivência e apoio.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental e aos professores que contribuíram para minha formação.

Aos colegas Juliana, Marcos e Luan, pela contribuição e auxílio em sala de aula.

À Fiocruz Rondônia que proporcionou o ambiente de laboratório e equipamentos para realização do trabalho.

Aos membros da banca examinadora, pela imensa contribuição na finalização do trabalho.

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Coordenadas dos pontos de captura de <i>Anopheles</i> spp. do Projeto de Monitoramento de Vetores de Importância Médica – MONVET em Rondônia .....	24
Tabela 2. Primers iniciadores específicos para amplificação de fragmentos de DNA do rRNA de <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i> segundo metodologia descrita por Snounou (1996) .....	28
Tabela 3. Anofelinos analisados por PCR para detecção de <i>Plasmodium</i> spp. distribuídos por mês de captura nas áreas de influência da UHE Jirau de abril de 2011 a junho de 2012 com espécies mais frequentes destacadas a cada mês .....	33
Tabela 4. Porcentagem de infecção natural encontrada nos mosquitos por espécie de <i>Plasmodium</i> e de <i>Anopheles</i> coletados nas áreas de influência da UHE Jirau de abril de 2011 a junho de 2012 e relação com a infecção natural encontrada em humanos em regiões próximas à de estudo.....	34
Tabela 5. Teste Z para análise da taxa de infecção por <i>Plasmodium</i> spp. encontrada nas diferentes espécies de <i>Anopheles</i> coletados nas áreas de influência da UHE Jirau em Porto Velho-Rondônia de abril de 2011 a junho de 2012 .....	35
Tabela 6. Dados utilizados para análise de correlação entre mosquitos coletados, infectados e número de casos de malária notificados na microrregião coletada (área de influência da UHE Jirau) com intervalo de confiança da porcentagem de infecção encontrada, demonstrando os <i>An. darlingi</i> coletados, as demais espécies, o total de coletados, averiguados e positivos, além da taxa de infecção natural com seus intervalos de confiança.....	38
Tabela 7. Revisão de trabalhos realizados na região amazônica com infecção natural por <i>Plasmodium</i> spp. em mosquitos do gênero <i>Anopheles</i> .....	40

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> spp. no hospedeiro vertebrado e invertebrado	16
Figura 2. Distribuição do IPA segundo municípios do estado de Rondônia.....	19
Figura 3. Áreas de influência direta e indireta das usinas do rio Madeira em Rondônia - Jirau e Santo Antônio .....	20
Figura 4. Pontos de captura de <i>Anopheles</i> spp. distribuídos ao longo da BR364 e às margens do rio Madeira, com referência aos pontos e coordenadas descritas na tabela 1. ....	25
Figura 5. Capturador de castro - Copo/gaiola com tela e entrada de borracha para armazenagem dos mosquitos capturados em campo durante o projeto MONVET.....	25
Figura 6. Esquema das técnicas laboratoriais realizadas para detecção de <i>Plasmodium</i> spp. em <i>Anopheles</i> spp. capturados nas áreas de influência da UHE Jirau em Rondônia .....	27
Figura 7. Esquema da amplificação do fragmento de DNA da região 18SrRNA por Reação em Cadeia da Polimerase realizada em duas etapas (Nested PCR).....	29

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Número de casos de malária notificados no ano de 2012 em 21 estados do Brasil.....	17
Gráfico 2. Número de casos de malária notificados em Rondônia de 2005 a 2012.....	18
Gráfico 3. Distribuição dos <i>An. darlingi</i> analisados por mês de captura do Projeto de Monitoramento de Vetores da UHE Jirau em Rondônia de abril de 2011 a junho de 2012 .....	31
Gráfico 4. Distribuição das demais espécies de <i>Anopheles</i> analisadas para a infecção por <i>Plasmodium</i> spp. por mês de captura do Projeto de Monitoramento de Vetores da UHE Jirau em Rondônia de abril de 2011 a junho de 2012 .....	32
Gráfico 5. Número de casos de malária notificados na microrregião estudada pertencente às áreas de influência da UHE Jirau em Porto Velho-Rondônia de abril de 2010 a junho de 2013 .....	36
Gráfico 6. Representação da análise de correlação não-paramétrica entre número de casos de malária na microrregião de estudo e o total de mosquitos coletados.....	36
Gráfico 7. Representação da análise de correlação não-paramétrica entre número de casos de malária na microrregião de estudo e a infecção natural encontrada nos mosquitos..	37



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

PCR	Polimerase Chain Reaction – Reação em Cadeia da Polimerase
OMS	Organização Mundial de Saúde
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
IPA	Índice Parasitológico Anual
UHE	Usina Hidrelétrica
TBE	Tampão Tris/Borato/EDTA
UV	Ultra-violeta
TEMED	N-N-N-N-Tetrametiletilenodiamina
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
CEPEM	Centro de Pesquisa em Medicina Tropical de Rondônia
IPEPATRO	Instituto de Pesquisa em Patologias Tropicais
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
ESBR	Energia Sustentável do Brasil
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
SIVEP	Sistema de Informações de Vigilância Epidemiológica

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
1.1 VETORES DA MALÁRIA .....	12
1.2 A MALÁRIA .....	15
1.3 EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA .....	17
1.4 O EMPREENDIMENTO HIDRELÉTRICO .....	19
1.5 AVALIAÇÃO MOLECULAR DA INFECÇÃO NATURAL .....	22
 <b>2. OBJETIVO .....</b>	 <b>23</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
 <b>3. METODOLOGIA .....</b>	 <b>24</b>
3.1 DESCRIÇÃO DA AMOSTRA .....	24
3.2 ANÁLISE MOLECULAR .....	26
3.3 EXTRAÇÃO DE DNA .....	27
3.4 AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA POR PCR .....	27
3.4.1 PCR em Nested para 18S RNA Ribossomal – rRNA:.....	27
3.5 ANÁLISE DE DADOS .....	29
 <b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	 <b>31</b>
 <b>5. CONCLUSÕES .....</b>	 <b>47</b>
 <b>6. REFERÊNCIAS .....</b>	 <b>49</b>
 <b>APÊNDICE I.....</b>	 <b>56</b>
<b>APÊNDICE II .....</b>	<b>58</b>

## RESUMO

Os insetos vetores têm papel importante na disseminação de patógenos emergentes. A família Culicidae tem atraído a atenção da saúde pública por abrigar organismos envolvidos na transmissão de diversas doenças. Vetores como o *Culex quinquefasciatus*, o *Aedes aegypti*, e os do gênero *Anopheles*, são responsáveis pela transmissão de doenças importantes como filariose, dengue e malária, respectivamente. Processos antrópicos como a urbanização, construções e invasão de áreas preservadas, contribuem para a disseminação desses vetores e possivelmente afetam seus criadouros, alterando a dinâmica da transmissão das doenças. Em Rondônia está sendo construída a Usina Hidrelétrica de Jirau no rio Madeira. Medidas de controle são empregadas desde o início da construção visando a não disseminação de doenças, principalmente a malária, e controlando os casos inclusive nas áreas de influência das usinas do rio Madeira. Este trabalho teve como objetivo verificar a infecção natural por *Plasmodium vivax* e *P. falciparum*, agentes causadores da malária no Brasil, em espécies de *Anopheles* capturadas nas áreas de influência direta da Usina de Jirau em Rondônia, bem como comparar a taxa de infecção encontrada entre as espécies estudadas. Os mosquitos coletados foram identificados e encaminhados ao Laboratório de Genética para análise molecular. Foi realizada extração de DNA por NaOH e TrisHCL, amplificação do DNA por PCR e visualização do fragmento por eletroforese. Foram analisados 1872 mosquitos individualmente e destes 78 estavam positivos para *Plasmodium* spp. apresentando uma taxa de infecção de 4,2%. A porcentagem de infecção natural por espécie de parasita foi de 2,9% para *P. vivax*, 1% para *P. falciparum* e 0,3% para infecção mista. Dos positivos, 70,5% eram *P. vivax*, 23,1% *P. falciparum* e 6,4% infecção mista. As espécies de anofelinos encontradas parasitadas foram *An. darlingi*, *An. triannulatus*, *An. nuneztovari*, *An. konderi* e *An. braziliensis*, seguindo a ordem das espécies de *Anopheles* mais frequentes. Não houve diferença significativa entre as taxas de infecção encontradas nas espécies de *Anopheles* infectadas. É importante a detecção de outras espécies, além do *An. darlingi*, infectadas, o que mostra que outras espécies apresentam competência vetorial semelhante à do *An. darlingi*, principal vetor da bacia Amazônica, e que também podem se tornar potenciais vetores. A detecção de infecção natural é um dos principais parâmetros analisados no controle e monitoramento da malária, pois identifica as espécies de *Anopheles* e *Plasmodium* circulantes na região. O estudo fez parte de um relatório de acompanhamento da construção da Usina de Jirau realizado pelo Laboratório de Entomologia do IPEPATRO e FIOCRUZ Rondônia, com o objetivo de avaliar a dinâmica da transmissão e fornecer suporte entomológico na continuidade da implementação de medidas de controle da malária na região.

**Palavras-chave:** *Anopheles*, *Plasmodium*, PCR, Monitoramento, Malária.

## ABSTRACT

The insect vectors play an important role in the spread of emerging diseases. The family Culicidae has attracted the attention of public health for harboring organisms involved in the transmission of various diseases. Vectors such as *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* and *Anopheles* spp. are responsible for the transmission of important diseases such as filariasis, dengue and malaria, respectively. Anthropogenic processes such as urbanization, buildings and invasion of preserved areas, contribute to the spread of these vectors and possibly affect their breeding, altering the dynamics of disease transmission. The Jirau Power Plant is currently being built on the Madeira river-Rondonia. Control measures have been employed from the start of construction to avoid the spread of diseases, especially malaria, at the areas of influence of the plants on the Madeira river. This study aimed to determine the natural infection by *Plasmodium vivax* and *P. falciparum*, the causative agents of malaria in Brazil, in *Anopheles* species caught at the areas of direct influence of the Jirau powerplant in Rondônia, and to compare the infection rate found among species studied by classical test Z. The collected mosquitoes were identified and referred to the Genetics Laboratory for molecular analysis. DNA extraction by NaOH and TrisHCL, DNA amplification by PCR and visualization of the fragment by electrophoresis was performed. 1872 individual mosquitoes and these were analyzed 78 were positive for *Plasmodium* spp. presenting an infection rate of 4.2 %. The percentage of parasite infection was 2.9 % for *P. vivax*, *P. falciparum* to 1 % and 0.3 % for mixed infection. Among the positive sample, 70.5 % were *P. vivax*, *P. falciparum* 23.1 % and 6.4 % mixed infections. The species of parasitized *Anopheles* found were *Anopheles darlingi*, *An. triannulatus*, *An. nuneztovari*, *An. konderi* and *An. braziliensis*, following the order of the species of *Anopheles* more frequent in the collection. There was no significant difference between the infection rates found among infected *Anopheles* species. Detecting other infected species, besides *An. darlingi*, was an important finding, showing that other species are similar to vector competence of *Anopheles darlingi*, the main vector of the Amazon basin, and may also become potential vectors. Detection of natural infection is one of the main parameters analyzed in the control and monitoring of malaria, it identifies the species of *Anopheles* and *Plasmodium* circulating in the region. The study was part of a report monitoring the construction of the Jirau Power Plant performed by the Laboratory of Entomology IPEPATRO and FIOCRUZ Rondônia, aiming to assess the dynamics of transmission and provide entomological support the continuation of the implementation of measures to control malaria in the region.

**Keywords:** *Anopheles*, *Plasmodium*, PCR, Monitoring, Malaria.

## 1. INTRODUÇÃO

Os insetos vetores têm papel importante na disseminação de patógenos emergentes. A maioria dos principais patógenos, vírus, bactérias, protozoários e helmintos, pode ser transmitida por insetos hematófagos. A transmissão da doença por contato direto raramente acontece, necessitando ainda o patógeno de realizar uma parte do ciclo biológico dentro do vetor (ROSENBERG & BEARD, 2011).

A alimentação sanguínea é facilitada pela injeção de saliva no hospedeiro vertebrado. A saliva é proveniente das glândulas salivares, presentes no tórax dos mosquitos. A saliva contém diversas substâncias que auxiliam na alimentação do mosquito, causando vasodilatação e atividade anticoagulante. A glândula salivar assume papel importante na transmissão de doenças, pois a maioria dos patógenos são injetados no hospedeiro com a saliva durante o repasto sanguíneo (ELDRIDGE, 2004)

A família Culicidae tem atraído a atenção da saúde pública por abrigar organismos envolvidos na transmissão de diversas doenças (FORATTINI, 2002). Dentro desta família encontramos os mais importantes insetos hematófagos, popularmente conhecidos como mosquitos, muriçocas, carapanãs, etc. Estes vetores são responsáveis pela transmissão de doenças importantes como dengue e outras arboviroses, filariose, malária, entre outras (EIRAS, 2005).

O *Culex quinquefasciatus* da subfamília Culicinae é o principal transmissor da filariose, doença endêmica em regiões tropicais da Ásia e África que afeta cerca de 120 milhões de pessoas no mundo. É um mosquito altamente antropofílico presente nos trópicos de todo o mundo. O *Aedes aegypti* da subfamília Culicinae é vetor da febre amarela urbana e da dengue em todo o mundo (FORATTINI, 2002). No Brasil, entre Janeiro e Fevereiro de 2014, o Ministério da Saúde registrou 87 mil notificações no Brasil, observando uma queda com relação ao mesmo período de 2013 (BRASIL-Portal Brasil, 2014).

Os transmissores da malária estão incluídos em dois subgêneros: *Nyssorhynchus*, que compreende os vetores que se criam em coleções de água no solo, e *Kerteszia*, representando os mosquitos que utilizam bromeliáceas como criadouro (EIRAS, 2005).

O *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* da subfamília Anophelinae foi incriminado vetor da malária quando em 1931, durante epidemia em Belém do Pará,

foram analisadas 181 glândulas e foi encontrada infecção natural por esporozoítos em 5% dos mosquitos analisados (DEANE, 1986). O *An. darlingi* é a principal espécie transmissora da malária por ser altamente antropofílica e predominante em regiões endêmicas (SOUZA-SANTOS, 2002).

Esses insetos não são exclusivamente domiciliados, porém a urbanização exerce influência sobre a adaptação dos mosquitos. Os processos de intervenções humanas no ambiente provocam mudanças na atividade dos culicídeos. É importante que haja informação sobre a fauna de culicídeos em áreas preservadas inseridas no ambiente urbano, para avaliar o impacto antrópico na composição das espécies (TAIPE-LAGOS & NATAL, 2003).

### 1.1 VETORES DA MALÁRIA

A malária é transmitida pela picada da fêmea do mosquito *Anopheles*. Existem cerca de 400 espécies diferentes de mosquito do gênero *Anopheles*, mas apenas 30 são vetores de grande importância (WHO, 2013).

Os mosquitos são encontrados em lugares onde ocorre água parada, necessária para o desenvolvimento de seus estágios imaturos. Os mosquitos têm fase de ovo, quatro estágios larvares, única fase de pupa e adulto. Os anofelinos depositam ovos individuais na superfície da água. Cada ovo possui um par de ‘flutuadores’ que são utilizados para se manter na superfície da água para respirar (ELDRIDGE, 2004; FORATTINI, 2002).

Os mosquitos adultos possuem um único par de asas, característica da ordem Diptera. As fêmeas adultas têm seu aparelho bucal adaptado para sugar o sangue de vertebrados, para maturação de seus ovos, sendo este hábito, responsável pela sua importância como vetor de doenças, enquanto que os machos têm probóscide adaptada para sugar sumos de plantas e outras fontes de açúcar (ELDRIDGE, 2004).

Diversas espécies de *Anopheles* são ou foram consideradas vetores da malária no Brasil, como *An. darlingi*, *An. aquasalis*, *An. triannulatus*, *An. albitarsis*, *An. deaneorum*, *An. nuneztovari*, *An. cruzii*, *An. bellator* e *An. homunculus* (TADEI e cols., 1988; ROSA-FREITAS e cols., 1998). O *An. darlingi* é considerado na região amazônica como vetor primário. Vetor primário ou principal é o mosquito epidemiologicamente capaz de dar origem a contato eficaz com o hospedeiro, transmitindo o patógeno, já o vetor secundário ou auxiliar, é o mosquito que, dependendo das circunstâncias (densidade, disponibilidade

de alimento), pode dar origem a contato eficaz (CONSOLI E LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Nos demais países da América do Sul são considerados os principais vetores da malária: *An. albimanus*, *An. darlingi* e *An. nuneztovari* na Colômbia (ZAPATA e cols., 2007); *An. darlingi* e *An. benarrochi* no Peru (TURELL e cols., 2008); *An. darlingi* na Bolívia (HARRIS e cols., 2006); *An. marajoara*, *An. darlingi* e *An. aquasalis* na Venezuela (MORENO e cols., 2007). Pode-se observar que o *An. darlingi* está presente em todos os países, sendo considerado o principal vetor da malária na América do Sul.

O Peru tem um elevado número de casos de malária, a maioria provenientes da Amazônia peruana. Esta prevalência é devido à incidência de *An. darlingi*, que tem se elevado com o tempo (PINEDO-CANCINO e cols., 2006), sendo considerado principal vetor no local (FLORES-MENDOZA e cols., 2004). O *An. benarrochi*, espécie antropofílica que também possui alta prevalência no local (CONN e cols., 2013) parece exercer papel importante na transmissão da malária no Peru e já foi reportado como vetor primário (CALDERÓN e cols., 1995), porém, em estudo de infectividade artificial não apresentou competência vetorial (KLEIN e cols., 1991).

Na Colômbia, *An. albimanus*, *An. darlingi* e *An. nuneztovari* são considerados vetores principais da malária (QUIÑONES e cols., 2006).

O *An. darlingi* é o principal vetor da malária na Bacia Amazônica da América do Sul (TADEI E TCHATCHER, 2000; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA e cols., 1989), além de ser essencialmente antropofílico e predominante nas regiões de alto risco, contribuindo para a manutenção dos altos níveis de transmissão (SOUZA-SANTOS, 2002; GIL e cols., 2007). Na região norte, além do *An. darlingi*, também estão presentes o *An. nuneztovari*, *An. triannulatus* e *An. braziliensis*, porém como vetores secundários. O *An. albitarsis* predomina em regiões de Roraima (SILVA-VASCONCELOS e cols., 2002). O *An. aquasalis* é encontrado em grande densidade em regiões do Pará (MASCARENHAS e cols., 2009), e é considerado vetor importante nessa região, presente também no Equador e na Venezuela (FAIRLEY e cols., 2002).

Quanto ao tipo de criadouro, o *An. darlingi* utiliza preferencialmente grandes coleções de água para se desenvolver, como lagos e represas, podendo na estação seca, se desenvolver até em poças de água, comportamento este semelhante ao do *An. nuneztovari* e *An. triannulatus* que se criam em lagoas e poças de água turva. Assim como o *An. darlingi*, o *An. braziliensis* também se cria em águas represadas e preferencialmente limpas (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; MUCCI, 2008). MARTINS,

Régia de Lourdes (2010) em seu estudo de caracterização de criadouros de *Anopheles* spp. em Porto Velho relata que a maioria dos criadouros está a uma distância de até 100 metros de área habitada e possui sombreamento. A maioria dos criadouros é constituída por represas (25,7%), seguida de canais (20%), córregos, lagoas e brejos, sendo grande parte (25,7%) de água turva.

Várias espécies de mosquito podem utilizar-se de água acumulada em buracos de árvores, bromeliáceas, cascas de frutos ou folhas caídas para criadouros, principalmente o subgênero *Kerteszia*. Mosquitos do subgênero *Kerteszia* já foram considerados vetores primários da malária no sul do Brasil e responsáveis por endemias. O *An. cruzii*, *An. bellator* e *An. humunculus*, são vetores da chamada “malária de bromélia”, transmitida por anofelinos que se criam em bromélias ou gravatás. A “malária de bromélia” ocorreu no Brasil sob forma endêmica de São Paulo ao Rio Grande do Sul (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; DEANE, 1986).

Dentre as espécies de mosquito essencialmente zoofílicas, mas que também possuem hábitos oportunistas podendo picar o homem dependendo do local em que esteja e do horário destacam-se o *An. braziliensis*, *An. nuneztovari* e *An. triannulatus* (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). O *An. darlingi* e o *An. deaneorum* demonstram preferência por se alimentar em humanos. O comportamento do vetor e preferência alimentar afetam diretamente a intensidade da malária. Estudos realizados em localidades da Amazônia revelam que o *An. darlingi* tem preferência por picar no crepúsculo/noite (KLEIN e cols, 1991).

Na região amazônica, espécies como *An. triannulatus*, *An. matogrossensis*, *An. nuneztovari*, *An. braziliensis*, *An. darlingi*, *An. mediopunctatus*, e *An. albitarsis* já foram encontradas infectadas por *Plasmodium* spp. (TADEI & TCHATCHER, 2000).

Klein e colaboradores (1991) trabalharam com a comparação de infectividade artificial entre o *An. darlingi* e outras sete espécies de *Anopheles* em Rondônia, e observaram que o *An. darlingi* foi a espécie mais infectada por *Plasmodium* spp.

Em Rondônia, Oliveira-Ferreira e colaboradores (1990) realizaram um estudo de infectividade natural em anofelinos utilizando a técnica de ELISA. No estudo de Oliveira-Ferreira e colaboradores (1990), as taxas de infectividade foram variáveis entre as espécies variando de 0,5% em *An. darlingi* e *An. triannulatus* e 1,4% em *An. braziliensis*. O aparecimento de espécies como *An. triannulatus*, *An. braziliensis* e *An. albitarsis* infectadas, pode estar relacionado às mudanças ambientais e na fauna do local fazendo



com que os anofelinos entrem em contato com os humanos (OLIVEIRA-FERREIRA e cols., 1990).

Outros autores realizaram trabalhos de análise de infecção natural utilizando a técnica de ELISA, PCR e microscopia. As porcentagens encontradas são de 0,27% a 5,6% variando de acordo com o local do estudo, metodologia utilizada, espécie de *Anopheles* analisada e tamanho amostral (OLIVEIRA-FERREIRA e cols., 1990; MORENO e cols., 2004; TADEI & THATCHER, 2000; CORTE-DOS-SANTOS e cols., 2005, 2009; REZENDE e cols., 2009; GIL e cols., 2007).

## 1.2 A MALÁRIA

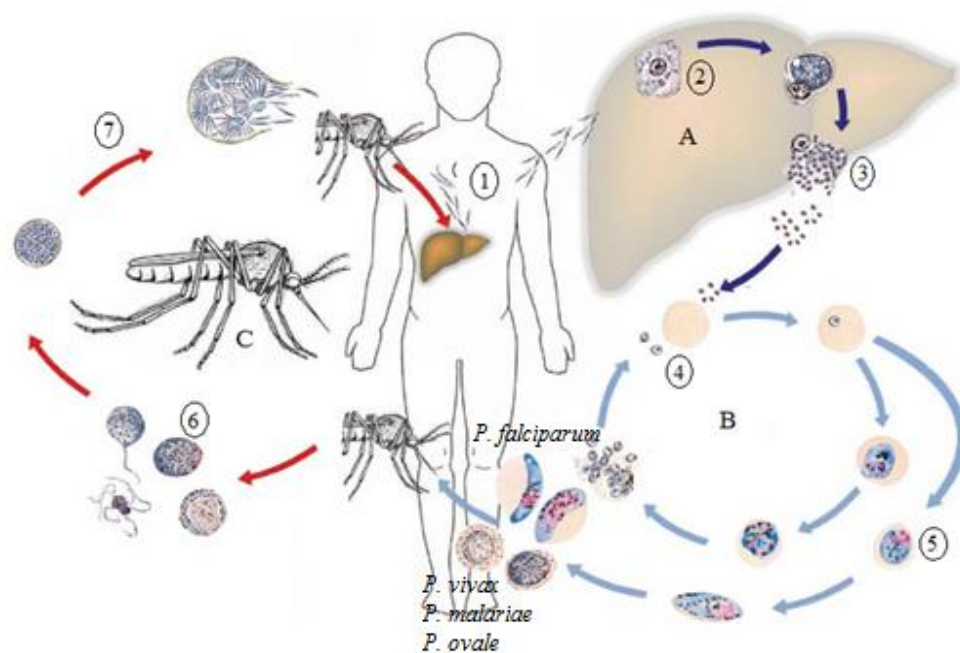
A malária é uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, e transmitida por mosquitos do gênero *Anopheles*. Em 2012, 3,4 bilhões de pessoas no mundo estavam em áreas de risco de malária, com uma estimativa de 207 milhões de casos e 627.000 mortes. Das mortes estimadas, 90% ocorreram na África Subsaariana em crianças menores de 5 anos de idade (77% dos casos) (WHO, 2013).

A doença se manifesta por febre alta, calafrios, náuseas e cefaléia (MONTEIRO e cols., 2013). As características clínicas que apontam para o diagnóstico da malária são os tremores, febre alta, suor intenso e dores no corpo. Nos casos complicados, podem ainda ocorrer dor abdominal forte, sonolência e redução da consciência podendo levar ao coma nos casos de malária cerebral (BRASIL-Manual de Diagnóstico Laboratorial de Malária, 2005).

O agente causador da malária pertence ao filo Apicomplexa, família Plasmodiidae e ao gênero *Plasmodium* (BRAGA & FONTES, 2005). Existem diversas espécies de *Plasmodium*, mas apenas cinco espécies parasitam o homem: *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi* (WHO, 2013).

O ciclo de vida do *Plasmodium* spp. se dá no hospedeiro definitivo, o mosquito e no hospedeiro intermediário, o homem (Figura 1).

**Figura 1. Ciclo de vida do *Plasmodium* spp. no hospedeiro vertebrado e invertebrado**



**Fonte:** Center for Disease Control – CDC adaptado (Disponível em <http://www.cdc.gov/>)

O ciclo de vida do *Plasmodium* spp. se inicia durante o repasto sanguíneo quando a fêmea inocula os esporozoítos na derme do hospedeiro humano. Os esporozoítos invadem os capilares sanguíneos, migram para o fígado e invadem os hepatócitos. No caso de *P. vivax* e *P. ovale*, as formas infectantes são capazes de se alojar no fígado e se manter no estado de latência, podendo mais tarde causar recaídas. Os esporozoítos se diferenciam em trofozoítos pré-eritrocíticos, se multiplicam por esquizogonia e se transformam em merozoítos (KAPPE e cols., 2003).

Os merozoítos rompem os hepatócitos, migram para a corrente sanguínea e invadem os eritrócitos onde se multiplicam por esquizogonia. Os merozoítos rompem o eritrócito para liberação e invasão de novas células. Começa a diferenciação em estágios sexuais – os gametócitos feminino e masculino que serão ingeridos pelo mosquito.

No intestino médio do mosquito, os gametócitos femininos se diferenciam em macrogameta e os gametócitos masculinos formam 8 microgametas cada um. Os macro e microgametas se fundem gerando o zigoto e posteriormente o oocineto. O oocineto atravessa a matriz peritrófica e se encista no epitélio do intestino sendo denominado de oocisto. Ocorre divisão esporogônica e liberação de esporozoítos que se disseminam pela hemolinfa até as glândulas salivares (CDC, 2014).

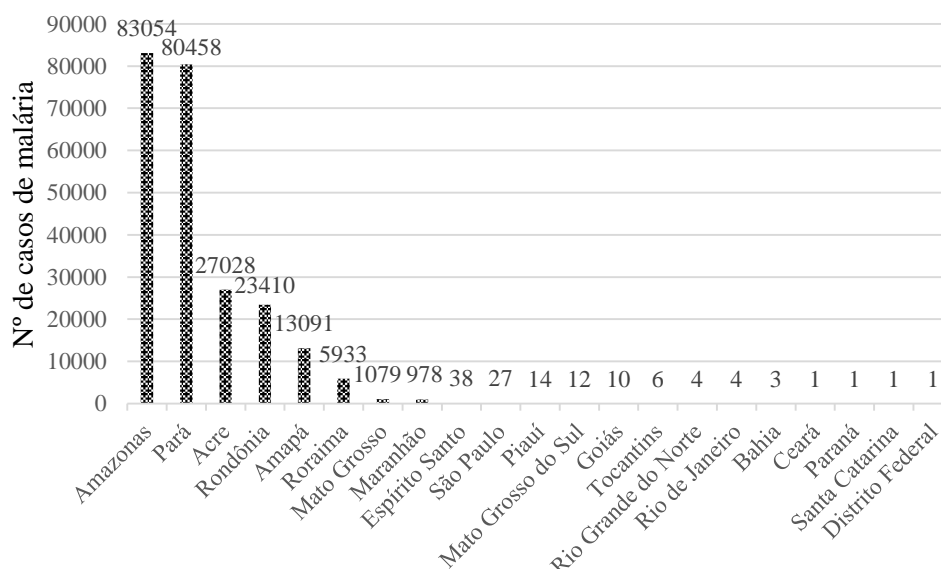
A malária causada por *P. vivax* é considerada a forma mais branda da doença, já a malária causada por *P. falciparum* é caracterizada pela forma grave, podendo levar a morte. Porém, há relatos de que o *P. vivax* não é responsável apenas pela malária branda, sendo responsável também, em casos de coinfeção com outras doenças, por contribuir para a morte do indivíduo (ANDRADE e cols, 2010; LACERDA e cols, 2012).

### 1.3 EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA

As taxas de mortalidade por malária caíram em todo o mundo cerca de 45%, devido às medidas de controle empregadas contra a doença. Isso tem sido observado desde 2000, onde mais da metade dos países com transmissão contínua da malária registram diminuições na incidência, internação e morte por malária. (WHO, 2013).

A malária no Brasil está concentrada na região amazônica, mais precisamente nos estados do Amazonas, Pará, Acre e Rondônia, consideradas as áreas de alto risco de contrair a doença, segundo os dados do Data SUS (Gráfico 1).

**Gráfico 1. Número de casos de malária notificados no ano de 2012 em 21 estados do Brasil.**



**Fonte:** BRASIL-Data SUS

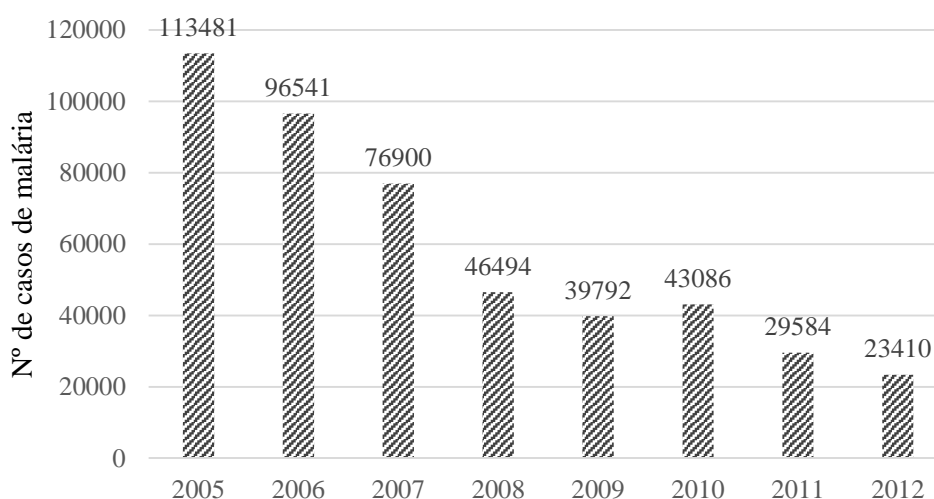
**Obs.:** Os estados Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Minas Gerais e Rio Grande do Sul não tiveram casos notificados em 2012.

Os estados fora da região Amazônica possuem os casos de malária controlados hoje em dia, apresentando ainda os casos importados. Um estudo feito em São Paulo de

1980 a 1983 por Wanderley e colaboradores (1985), mostrou que 97% do total de casos (5.370) do estado no período eram casos importados, sendo que 93,5% deles eram provenientes da Amazônia, e a maior parte dos casos dessa região (35%) eram oriundos do estado de Rondônia. Na região de São Paulo a transmissão era decorrente da presença dos mosquitos do subgênero *Kerteszia* (WANDERLEY e cols., 1985).

O número de casos de malária em Rondônia vem diminuindo gradativamente (Gráfico 2) a partir do ano 2005, quando foram notificados 113.481 casos e em 2012 foram 23.410 casos (BRASIL, Data SUS, 2014).

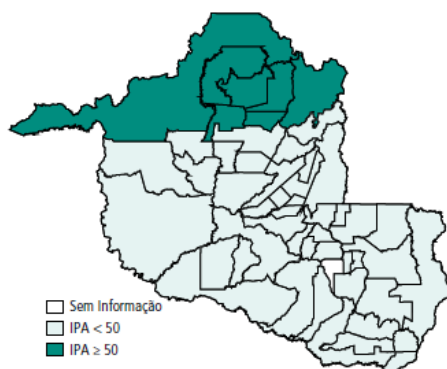
**Gráfico 2. Número de casos de malária notificados em Rondônia de 2005 a 2012.**



**Fonte:** BRASIL, Data SUS, 2014.

Os municípios de Porto Velho, Candeias do Jamari, Machadinho d'Oeste e Cujubim apresentaram um IPA (Índice Parasitológico Anual) de mais de 50 casos por 1000 habitantes (Figura 2) (BRASIL, Relatório de Situação, 2011). O IPA corresponde ao número de exames positivos para malária por mil habitantes realizados em determinado espaço geográfico no ano em questão, estimando o risco de ocorrência anual de casos de malária. Em todo o estado de Rondônia, até 2012, o IPA era de 14,7 (BRASIL-Data SUS, 2014).

**Figura 2. Distribuição do IPA segundo municípios do estado de Rondônia**



**Fonte:** BRASIL, Relatório de Situação, 2011.

Dos casos de malária notificados em Rondônia em 2012, 96% foram decorrentes de *P. vivax*, 3,5% por *P. falciparum* e 0,5% por infecção mista das duas espécies (BRASIL-Data SUS, 2014).

Segundo o Programa de Erradicação da Malária da OMS, um foco de malária é considerado um local definido situado em uma área anteriormente ou atualmente atingida pela doença com fatores epidemiológicos contínuos necessários para a transmissão da malária. A erradicação da malária se encerra com a eliminação de focos residuais da doença através da aplicação de medidas que eliminem a malária no local, como a borrifação de inseticidas dentro das residências (WHO, 2007). Em 2012, 88 países distribuíram mosquiteiros impregnados com inseticida gratuitamente e implementaram a borrifação residual para o controle da malária. O monitoramento da resistência a inseticidas é elemento necessário da implementação de intervenções de controle do vetor (WHO, 2013).

#### 1.4 O EMPREENDIMENTO HIDRELÉTRICO

A Usina Hidrelétrica de Jirau – UHE Jirau está em construção no Rio Madeira, em Rondônia a 120 km de Porto Velho. A construção está sendo realizada pela ESBR – Energia Sustentável do Brasil. A UHE Jirau é a maior usina de energia sustentável registrada pelas Nações Unidas (ESBR, 2013).

Com a formação dos reservatórios de água, fatores como eliminação de grandes áreas florestais, alterações no ciclo hidrológico e na biodiversidade e deslocamento de populações são favoráveis ao aparecimento ou incremento de doenças em função do

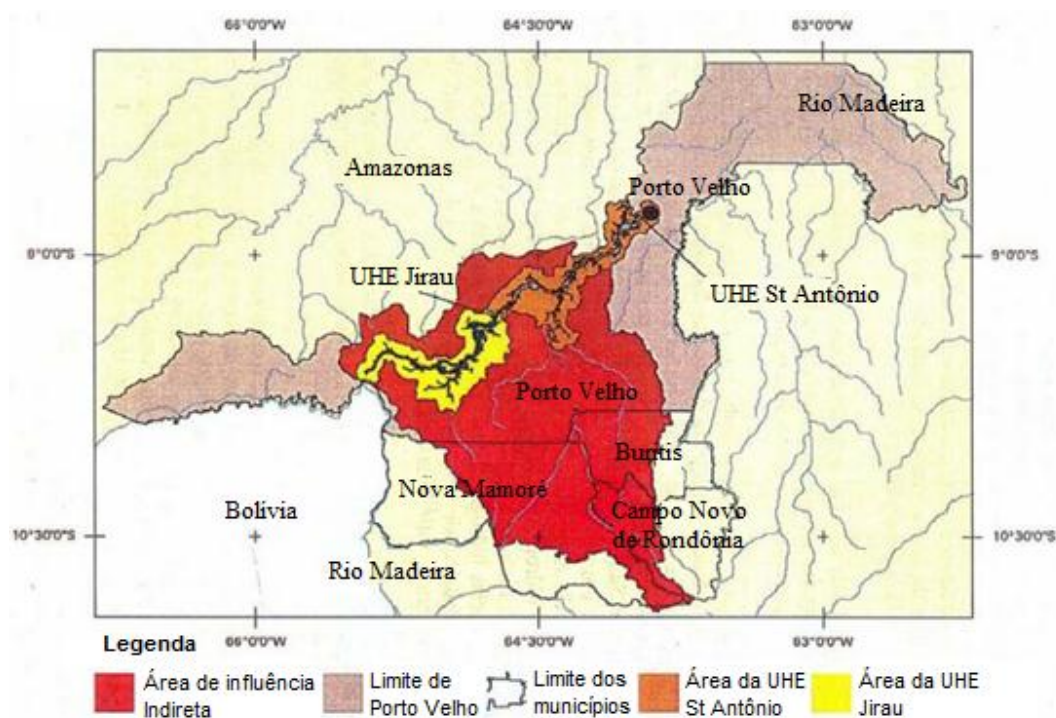
aumento do fluxo migratório e dos criadouros de vetores de doenças (BRASIL, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2008). Além disso, as construções alteram as condições de vida da população ribeirinha e os padrões de desenvolvimento local.

Segundo o Relatório da Prefeitura de Porto Velho sobre o Plano de Ação de Controle da Malária (2012), com a construção das Usinas do rio Madeira, a população de Porto Velho aumentou de 2009 a 2010 aproximadamente 10,52%.

Nos primeiros meses de formação dos reservatórios das usinas hidrelétricas, as condições da água tendem a ser impróprias para a reprodução dos anofelinos. Ocorrem mudanças no pH e nível de oxigênio da água. Após o período de construção e estabilizadas as condições da água, a situação se reverte podendo ser formados novos criadouros ou criadouros já existentes, podendo aumentar a densidade anofélica (BRASIL, Plano de Ação de Controle da Malária, 2012).

Medidas de controle vetorial já são tomadas nas áreas de influência da UHE de Santo Antônio desde 2010. Parte da área de influência da UHE de Jirau é comum à de Santo Antônio e também está dentro da área onde a medida está implantada (Figura 3).

**Figura 3. Áreas de influência direta e indireta das usinas do rio Madeira em Rondônia - Jirau e Santo Antônio**



Fonte: BRASIL, Relatório da Secretaria de Vigilância em Saúde, 2008 (modificado)

A análise de infecção natural por *Plasmodium* spp. em *Anopheles* spp. é um dos objetivos do Projeto de Monitoramento de Vetores de Importância Médica – MONVET na UHE de Jirau, realizado pela equipe técnica do laboratório de Entomologia do IPEPATRO e Fiocruz Rondônia. Este projeto abrange o monitoramento de espécies como *Aedes aegypti* e outros culicídeos, triatomíneos, flebotomíneos e simulídeos, e é realizado nas áreas de influência da UHE.

Parte da população reside às margens do rio Madeira e outra parte em distritos ao longo da rodovia BR 364. Essas populações são diretamente atingidas pelas UHE de Santo Antônio e Jirau através do aumento da lâmina d'água do rio Madeira e seus afluentes. O aumento na área da lâmina d'água do rio Madeira, que será provocado pela construção das duas UHE, manterá áreas permanentemente alagadas e propícias à proliferação do vetor da malária (KATSURAGAWA e cols., 2009).

Katsuragawa e colaboradores (2009) estudaram, antes da implantação das obras da UHE de Jirau, os aspectos hematológicos e prevalência da malária por PCR em moradores das áreas de influência da UHE Jirau, constatando uma taxa de infecção de 23,8% na população, sendo 17,8% por *P. vivax*, 4,4% por *P. falciparum* e apenas 1,6% por infecção mista.

Medidas de controle têm sido empregadas em Rondônia visando a não disseminação da doença e controle dos casos principalmente nas áreas de influência das usinas do rio Madeira. As mais empregadas são o tratamento imediato dos casos diagnosticados, distribuição de mosquiteiros impregnados com inseticida, borrifação residual e espacial, além de identificação e tratamento de assintomáticos (BRASIL, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2008).

No estudo de culicídeos em área de influência da construção de uma represa no estado de São Paulo, a biodiversidade do local já se encontrava alterada devido à pecuária. Houve elevação na densidade anofélica relacionada às condições ecológicas favoráveis à proliferação de mosquitos, como o acúmulo de vegetação aquática (BICUDO-DE-PAULA & GOMES, 2007).

Ferrete (2009) em seu estudo na área de barragem da Hidrelétrica do rio Araguari em Minas Gerais, observou que, na etapa da construção, a densidade de anofelinos aumentou devido às alterações causadas pelas obras e ausência de animais silvestres, fazendo com que os mosquitos se dispersassem à procura de alimento. Além disso, os anofelinos se adaptaram a criação em pequenas e médias poças de água.

## 1.5 AVALIAÇÃO MOLECULAR DA INFECÇÃO NATURAL

A identificação de *Plasmodium* spp. em anofelinos por dissecação e microscopia é o método mais tradicional por ser um diagnóstico rápido e de baixo custo. Porém, não é possível a determinação da espécie de *Plasmodium* apenas pelo exame morfológico (AREZ e cols., 2000).

Com o desenvolvimento da PCR, o diagnóstico molecular da malária se mostrou promissor. O diagnóstico da malária por PCR possui alto custo e complexidade técnica, sendo utilizado em laboratórios de pesquisa (BRASIL-Manual de Diagnóstico Laboratorial de Mal, 2005).

A PCR é uma reação em que uma pequena quantidade de um segmento do DNA é amplificada *in vitro* utilizando uma enzima para polimerização. Na identificação do parasita da malária, a amplificação de fragmentos específicos da subunidade menor do DNA ribossomal do parasita nos indicam gênero e espécie do mesmo. A metodologia descrita por Snounou (1996), que amplifica regiões do DNA ribossômico (18S rDNA), é a mais utilizada dentre as pesquisas da malária (FUGIKAHA e cols, 2007).

O estudo de Ohrt e colaboradores (2002) compara a detecção de parasitas da malária no sangue humano por microscopia e por PCR, mostrando que a técnica molecular é mais sensível e específica. A microscopia subestima a prevalência de parasitas da malária tanto no sangue, quanto no mosquito (SNOUNOU e cols., 1993; MAHAPATRA e cols., 2006).

Considerando o exposto foi estudada a taxa de infecção natural pela técnica de PCR bem como a distribuição temporal das espécies de *Anopheles* capturadas nas áreas de influência da usina hidrelétrica de Jirau. A porcentagem de infecção observada foi comparada entre as espécies e com outros estudos que avaliaram infecção natural de *Anopheles* spp. com diferentes metodologias. Também foi considerada a incidência de malária na região.



## 2. OBJETIVO

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a infecção natural por *Plasmodium* spp. entre as espécies de *Anopheles* capturadas nas proximidades da Usina Hidrelétrica de Jirau-RO e analisar sua relação com alguns fatores epidemiológicos da malária.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Assinalar as espécies de *Anopheles* que ocorrem nas áreas de influência da Usina Hidrelétrica de Jirau
- b) Identificar as espécies de vetores que estão parasitadas por *Plasmodium* spp. na área de estudo.
- c) Identificar por meio de PCR as espécies de *Plasmodium* encontradas nas diferentes espécies de *Anopheles* capturadas na área de estudo e comparar a taxa de infecção natural entre elas.
- d) Avaliar uma possível correlação entre a abundância de anofelinos, taxa de infecção natural e o número de casos de malária no local.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 DESCRIÇÃO DA AMOSTRA

A quantidade de mosquitos analisada por PCR foi selecionada de acordo com o número mensal de indivíduos observados por espécie. Dessa forma, para cada espécie, buscou-se analisar mensalmente 100% dos mosquitos que possuíam total de até 20 espécimes capturados, 50% dos mosquitos com total de 21 a 100 espécimes, e 30% dos mosquitos com total acima de 100 espécimes capturados. Os espécimes que não estavam em condições de participar da análise molecular, por deterioração ou contaminação por fungos, não foram incluídos no estudo.

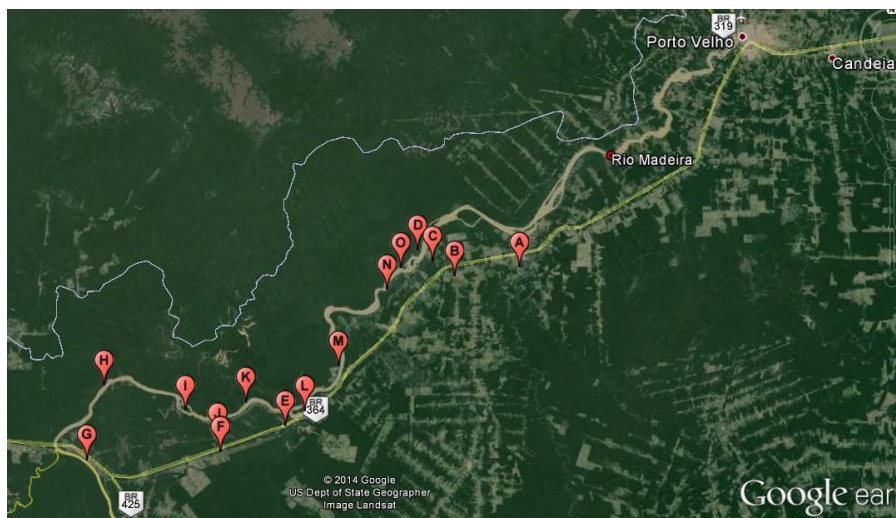
As capturas foram realizadas ao longo das margens do rio Madeira e da BR 364 em Rondônia, de abril de 2011 a junho de 2012, em pontos definidos (Tabela 1). A área de influência direta está localizada nas margens do rio Madeira (Figura 4) desde a Ilha do Padre (9°16' 12.01" S 64°38' 37.94" W) até a foz do rio Abunã (9°40' 50.20" S 65°26' 30.75" W) e na rodovia BR364 do distrito de Jaci Paraná (9°15' 52.06" S 64°24' 32.34" W) até Vila Abunã (9°41'57.00"S 65°22'12.00"W) (Relatório de Atividades – Monitoramento de Vetores de Importância Médica, 2012).

**Tabela 1. Coordenadas dos pontos de captura de *Anopheles* spp. do Projeto de Monitoramento de Vetores de Importância Médica – MONVET em Rondônia**

Ponto	Nome	GPS S	GPS W
A	Jaci Paraná	S 09° 16' 33.6"	W 64° 24' 52.2"
B	Nova Mutum Paraná	S 09° 17' 40.1"	W 64° 33' 34.3"
C	Poligonal lado direito	S 09° 15' 40.8"	W 64° 36' 31.1"
D	Poligonal lado esquerdo	S 09° 14' 12.4"	W 64° 38' 31.4"
E	Mutum Paraná	S 09° 37' 13.75"	W 64° 56' 16.91"
F	Ramal Primavera	S 09° 40' 31.70"	W 65° 04' 52.90"
G	Vila do Abunã	S 09° 41' 29.71"	W 65° 22' 38.82"
H	Igarapé São Simão	S 09° 31' 47.80"	W 65° 20' 25.60"
I	Ilha Cachoeira do Paredão	S 09° 35' 08"	W 65° 09' 33"
J	Faz. Ramal Primavera	S 09° 38' 46"	W 65° 05' 16"
K	Estação Ecológica Mojica	S 09° 34' 07"	W 65° 01' 31"
L	Ilha dois irmãos	S 09° 35' 16.5"	W 64° 53' 40"
M	Fazenda São Gonçalo	S 09° 29' 27.8"	W 64° 49' 10.22"
N	Sítio Samaritano (Sr Bento)	S 09° 19' 26.6"	W 64° 42' 37.9"
O	Igarapé Jirau	S 09° 16' 31.9"	W 64° 40' 46.2"

**Fonte:** Relatório de Atividades do Programa de Saúde Pública, 2012

**Figura 4. Pontos de captura de *Anopheles* spp. distribuídos ao longo da BR364 e às margens do rio Madeira, com referência aos pontos e coordenadas descritas na tabela 1.**



**Fonte:** Google Earth (acesso em Junho/2014)

Os mosquitos foram capturados pela técnica de Coleta por Atração em Humanos protegida (Projeto submetido ao Conselho de Ética em Pesquisa e aprovado sob parecer 117.823). Quatro diferentes indivíduos do sexo masculino pertencentes à equipe do projeto de monitoramento de vetores realizaram as coletas utilizando um capturador de castro (Figura 5).

**Figura 5. Capturador de castro - Copo/gaiola com tela e entrada de borracha para armazenagem dos mosquitos capturados em campo durante o projeto MONVET**



**Fonte:** PIMENTEL, IF (2014) Acervo pessoal

As coletas realizadas em conjunto no peri e intradomicílio tinham duração de 12 horas (18:00h – 6:00h) e as realizadas somente no peridomicílio tinham duração de 6 horas (18:00h – 00:00h). Os mosquitos capturados foram transportados em copos plásticos com tela, identificados por meio de lupas com o auxílio de chave dicotômica descrita por Consoli e Lourenço-de-Oliveira (1994) e acondicionados em microtubos devidamente identificados em freezer a -20°C para posterior análise molecular.

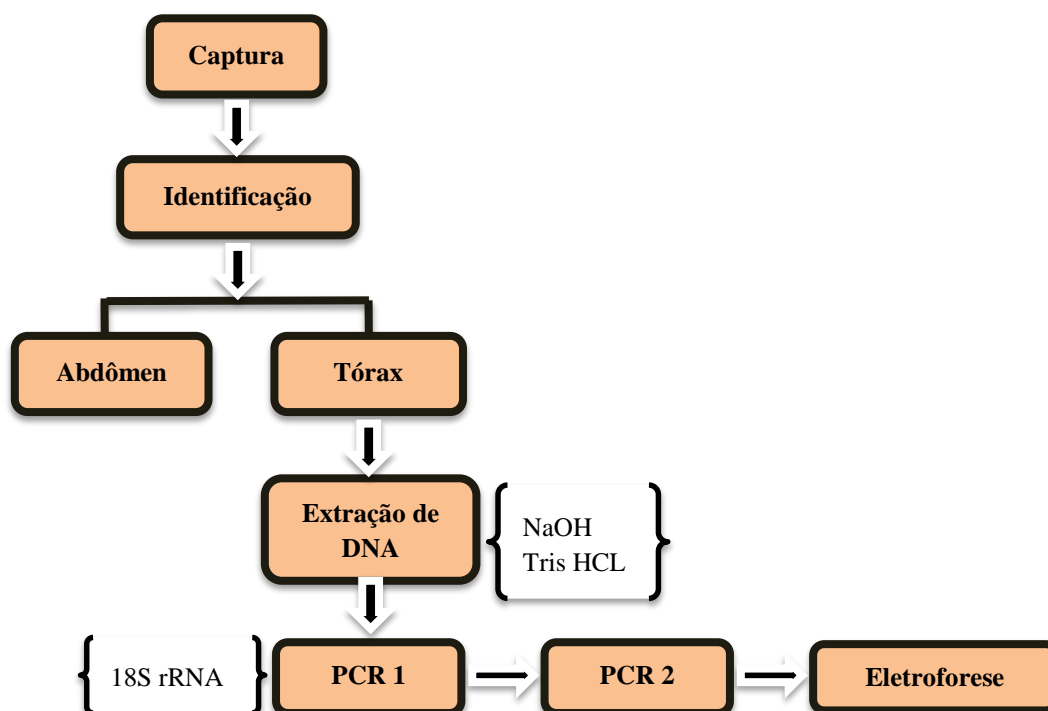
Os dados de quantitativo, triagem e identificação dos mosquitos foram cedidos pelo laboratório de Entomologia da Fiocruz Rondônia para este trabalho.

### 3.2 ANÁLISE MOLECULAR

A análise molecular foi realizada individualmente para cada espécime. Os mosquitos foram separados para análise aleatoriamente dentro dos grupos de espécies de *Anopheles* coletadas em um determinado mês.

Após o processo de captura, os mosquitos foram encaminhados ao Laboratório de Entomologia do IPEPATRO e Fiocruz Rondônia para a triagem e identificação (separação em gênero e espécie), e logo em seguida ao Laboratório de Genética para realização das técnicas de identificação molecular. Essas técnicas foram divididas em várias etapas como extração do DNA, amplificação por PCR e visualização dos fragmentos para comprovação da presença de DNA do parasita dentro do mosquito (Figura 6).

**Figura 6. Esquema das técnicas laboratoriais realizadas para detecção de *Plasmodium* spp. em *Anopheles* spp. capturados nas áreas de influência da UHE Jirau em Rondônia**



### 3.3 EXTRAÇÃO DE DNA

Os mosquitos foram cortados e separados em cabeça, tórax e abdômen, com o auxílio de um bisturi esterilizado e lupa, tomando as precauções durante a separação da glândula da cabeça, sendo apenas o tórax individualmente utilizado para a extração de DNA. O tórax do mosquito foi macerado em 20µl de Hidróxido de Sódio (NaOH) a 1M e levado ao banho-seco por 10 minutos a 80°C. A maceração foi realizada em microtubos de 1,5ml do tipo Eppendorf® com pistilos de polipropileno ambos autoclavados para esterilização. Após a incubação, foi adicionado 180 µl de Tris HCl a 0,2M e pH 7,5 para neutralizar a reação. Os dois reagentes podem ser mantidos em temperatura ambiente. O material foi armazenado a -20°C até o momento da PCR, quando os tubos foram centrifugados a 1500 rpm durante 2 minutos para coleta do sobrenadante que contém o DNA.

### 3.4 AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA POR PCR

#### 3.4.1 PCR em Nested para 18S RNA Ribossomal – rRNA:

Utilizando o método descrito por Snounou (1996), foi amplificada uma região do 18S rRNA correspondente aos parasitas (Apêndice I). Cinco microlitros (5µl) do sobrenadante da extração de DNA foram utilizados na reação de PCR utilizando a enzima Taq DNA Polimerase da Invitrogen® e primers específicos (Tabela 2).

**Tabela 2. Primers iniciadores específicos para amplificação de fragmentos de DNA do rRNA de *P. vivax* e *P. falciparum* segundo metodologia descrita por Snounou (1996)**

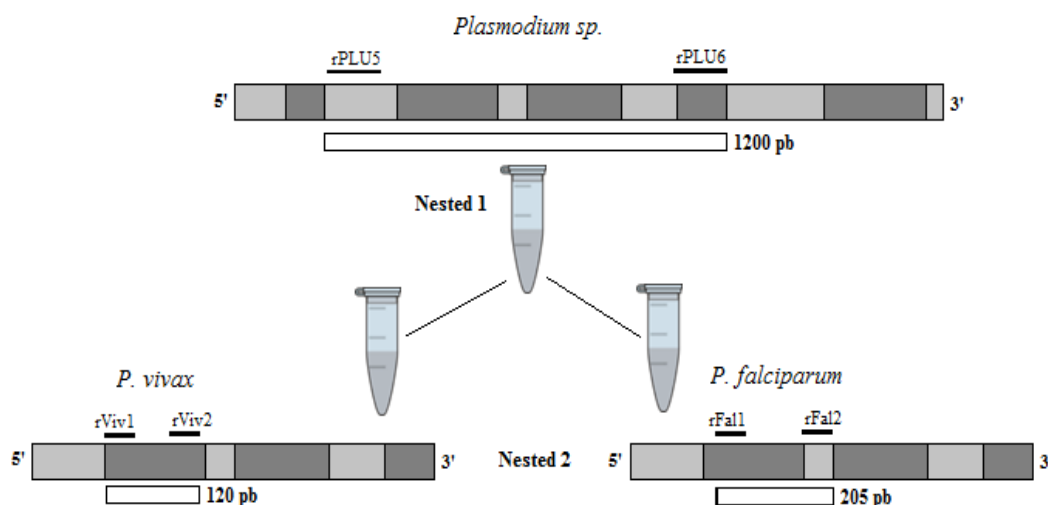
Nome	<sup>1</sup> Sequências	<sup>2</sup> Ori	<sup>3</sup> Pb
<b>rPlu5</b>	5'- CTT GTT GTT GCC TTA AAC TTC -3'	FOR	1200
<b>rPlu6</b>	5'- TTA AAA TTG TTG CAG TTA AAA CG -3'	REV	
<b>rViv1</b>	5'- CGC TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAC TGA TAC -3'	FOR	120
<b>rViv2</b>	5'- ACT TCC AAG CCG AAG CAA AGA AAG TCC TTA 3'	REV	
<b>rFal1</b>	5'- TTA AAC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT - 3'	FOR	205
<b>rFal2</b>	5' ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC 3'	REV	

<sup>1</sup>Sequências utilizadas neste estudo; <sup>2</sup>Ori – orientação dos óligos; For - forward e Rev – reverse; <sup>3</sup>Produtos em pares de bases

A reação foi feita em Nested, para identificação de gênero (Nested 1) e utilizando o seu produto foi feita a identificação da espécie (Nested 2) em *P. vivax* ou *P. falciparum*. O protocolo da reação (Apêndice I) foi realizado com base nas condições indicadas na bula da enzima utilizada, a Taq DNA Polimerase da Invitrogen®, com os primers descritos por Snounou (1996).

Após a realização da reação inicial para pesquisa do gênero *Plasmodium* spp. (Nested 1) a segunda PCR foi feita (Figura 7) para detecção e diferenciação das espécies *P. vivax* e *P. falciparum* (Nested 2).

**Figura 7. Esquema da amplificação do fragmento de DNA da região 18SrRNA por Reação em Cadeia da Polimerase realizada em duas etapas (Nested PCR)**



Fonte: Snounou (1996) modificada por PIMENTEL, IF.

O DNA da PCR Nested 2 foi substituído por 5 µl do produto de PCR da Nested 1 afim de uma maior quantidade e especificidade na amplificação.

O mesmo produto da PCR Nested 1 foi também utilizado na PCR Nested 2 de *P. falciparum*.

No total foram realizadas 5616 reações de PCR, 1872 Nested 1, 1872 Nested 2 *P. vivax* e 1872 Nested 2 *P. falciparum*.

As condições de temperatura da PCR foram alteradas com relação ao protocolo descrito por Snounou, 1996. Os ciclos foram diminuídos e as temperaturas de anelamento modificadas (APÊNDICE I).

### 3.5 ANÁLISE DE DADOS

A porcentagem de infecção natural foi calculada utilizando o número de mosquitos analisados como total (100%) e o número de mosquitos infectados (positivos x 100/analisados). Foi realizada análise descritiva dos dados, com apresentação das frequências absolutas e relativas e seus respectivos intervalos de confiança de 95%. Os limites inferiores e superiores foram calculados de acordo com o método clássico de Clopper e Pearson (1934), implementada no software Excel. O cálculo pode ser obtido no sítio da internet: <http://statpages.org/confint.html>.

Foram comparadas as porcentagens de infecção natural entre as diversas espécies, par a par, utilizando o clássico teste-Z para diferenças entre proporções. A hipótese nula do teste é de que a diferença entre as proporções não é significativa e a hipótese alternativa é de que a diferença é significativa. O nível de significância utilizado foi de 5%.

Visando avaliar uma possível relação entre proporção de mosquitos infectados e número de mosquitos coletados com o número de casos malária na região, foram realizadas análises de correlação não paramétrica. O número de casos de malária na região coletada foi cedido por banco de dados pelo laboratório de Epidemiologia do CEPEN, englobando pontos que estavam dentro de um raio de 5 km dos pontos de captura.



#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

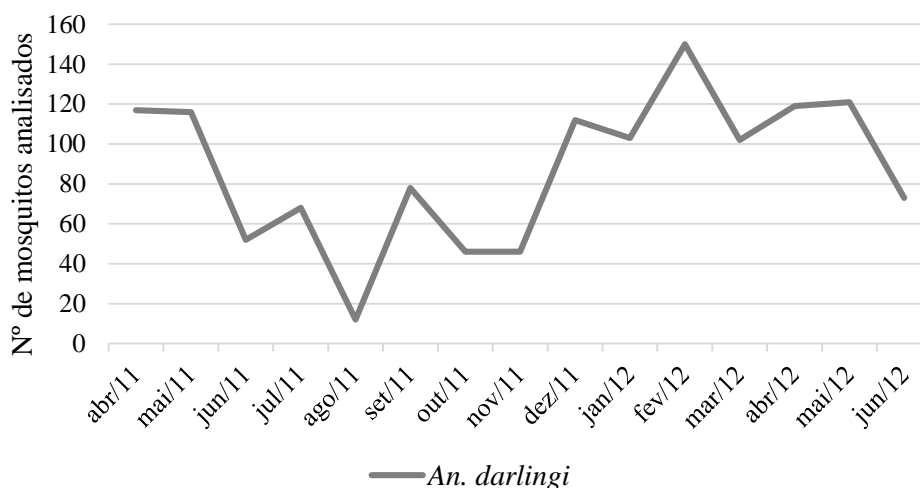
Foram coletadas 5856 fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* incluindo *An. darlingi*, *An. triannulatus*, *An. nuneztovari*, *An. konderi*, *An. braziliensis*, *An. deaneorum*, *An. costai*, *An. mattogrossensis* e *An. pseudotibiamaculatus*.

No estudo realizado por Gil e colaboradores em 2007 na região de Vila Candelária, área endêmica para malária em Rondônia, a espécie mais frequente foi *Anopheles darlingi*. A espécie com maior frequência analisada neste estudo foi *An. darlingi* (70,3%) seguida de *An. triannulatus* (11%), *An. nuneztovari* (6,1%), *An. konderi* (5,9%), *An. braziliensis* (5,5%), *An. deaneorum* (0,5%), *An. costai* (0,4%), *An. mattogrossensis* (0,3%) e *An. pseudotibiamaculatus* (0,05%).

Nos 15 meses de estudo foram coletados por mês em média 307 (I.C.95% 242,54...381,22; min. 41 - max. 570) *An. darlingi* e em média 390 (I.C.95% 322,47...469,19; min. 111 - max. 667) *Anopheles* spp. Foram observados em média 237 (I.C.95% 212,84...264,13; min. 166 - max. 308) casos de malária.

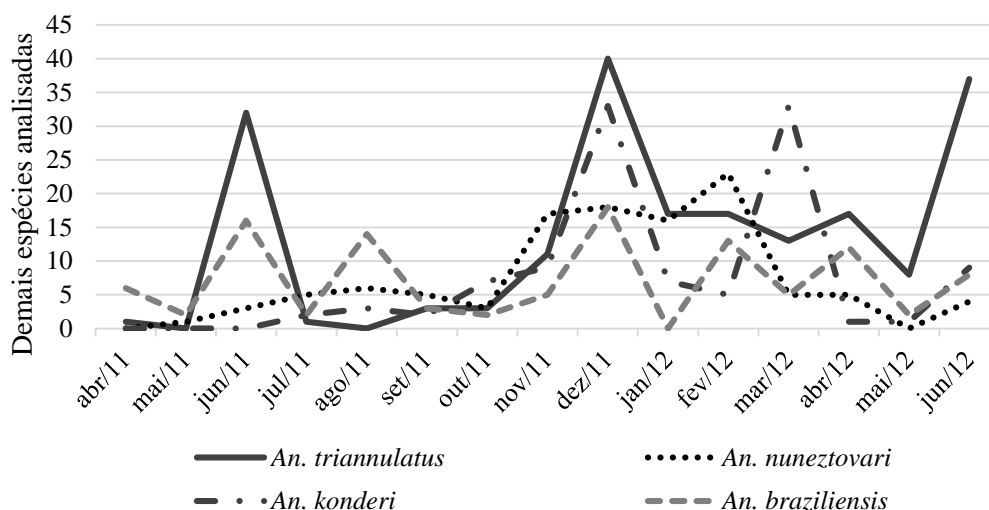
O *An. darlingi* foi o mais frequente em todos os meses de captura (Gráfico 3).

**Gráfico 3. Distribuição dos *An. darlingi* analisados por mês de captura do Projeto de Monitoramento de Vetores da UHE Jirau em Rondônia de abril de 2011 a junho de 2012**



De novembro de 2011 a abril de 2012 a densidade de algumas espécies (*An. triannulatus*, *An. nuneztovari*, *An. konderi* e *An. braziliensis*) também aumentou mostrando que o aumento não ocorre somente com *An. darlingi* (Gráfico 4).

**Gráfico 4. Distribuição das demais espécies de *Anopheles* analisadas para a infecção por *Plasmodium* spp. por mês de captura do Projeto de Monitoramento de Vetores da UHE Jirau em Rondônia de abril de 2011 a junho de 2012**



A abundância de *An. darlingi* se dá pela distribuição das áreas de captura e atividades realizadas próximas a esses locais, tais como construções e áreas agrícolas, abrigando os criadouros dessa espécie, já que o *An. darlingi* raramente é encontrado em floresta. A área de estudo possui quantidade de água propícia para a proliferação desse vetor (KATSURAGAWA e cols., 2010).

Foi observado no estudo que os mosquitos ocorreram com mais abundância nos períodos chuvosos na região. Isso possivelmente ocorre porque na estação chuvosa o mosquito utiliza grande variedade de coleções de água de tamanho e profundidades menores para reprodução (CONSOLI E LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

As espécies de *Anopheles* naturalmente infectadas com *Plasmodium* spp. foram *An. darlingi*, *An. triannulatus*, *An. nuneztovari*, *An. konderi* e *An. braziliensis* (Tabela 3).

**Tabela 3. Anofelinos analisados por PCR para detecção de *Plasmodium* spp. distribuídos por mês de captura nas áreas de influência da UHE Jirau de abril de 2011 a junho de 2012 com espécies mais frequentes destacadas a cada mês**

Espécies	I / NI	abr/11	mai/11	jun/11	jul/11	ago/11	set/11	out/11	nov/11	dez/11	jan/12	fev/12	mar/12	abr/12	mai/12	jun/12	Analizados
<i>An. darlingi</i>	I	9	8	5	2	0	5	5	1	18	2	0	0	0	1	0	<b>56</b>
	N.I.	108	108	47	66	12	73	41	45	94	101	150	102	119	120	73	<b>1259</b>
<i>An. triannulatus</i>	I	1	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1	1	1	<b>8</b>
	N.I.	0	0	30	1	0	3	3	11	38	17	17	13	16	7	36	<b>192</b>
<i>An. nuneztovari</i>	I	0	0	0	0	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	<b>4</b>
	NI	0	1	3	5	6	5	3	17	16	16	23	5	5	0	4	<b>109</b>
<i>An. konderi</i>	I	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	4	0	0	0	<b>5</b>
	NI	0	0	0	2	3	2	7	9	32	7	5	29	1	1	9	<b>107</b>
<i>An. braziliensis</i>	I	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	<b>5</b>
	NI	4	2	15	2	14	3	2	5	18	0	13	5	12	2	6	<b>103</b>
<i>An. deaneorum</i>	I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>
	NI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	1	0	2	1	2	<b>11</b>
<i>An. costai</i>	I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>
	NI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	3	1	0	1	<b>7</b>
<i>An. mattogrossensis</i>	I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>
	NI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3	1	<b>5</b>
<i>An. pseudotibiamaculatus</i>	I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>
	NI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	<b>1</b>
<b>Subtotal analisado</b>	I	12	8	8	2	0	5	7	1	23	2	0	4	1	2	3	<b>78</b>
	N.I.	112	111	95	76	35	86	56	87	198	147	211	157	156	134	133	<b>1794</b>

Legenda: I = Infectado; NI = Não Infectado

A porcentagem de infecção natural dos mosquitos detectada por PCR por *Plasmodium vivax* foi de 2,9%, quase 3 vezes maior que por *P. falciparum* (1%) e a infecção mista dessas duas espécies foi de 0,3%. A taxa geral de infecção natural dos mosquitos foi de 4,2%.

Comparando a frequência relativa das espécies de *Plasmodium*, pode-se dizer que a taxa de infecção em mosquitos observada no presente estudo (*P. vivax* -70,5%; *P. falciparum* - 23,1%; infecção mista - 6,4%) corrobora com os dados de maior prevalência humana de malária por *P. vivax* na região, conforme o estudo de Katsuragawa e colaboradores (2009), que averiguaram a população humana residente nas áreas de influência da usina e descobriram que 74,8% das infecções humanas eram causadas por *P. vivax*, 18,4% por *P. falciparum* e 6,4% por infecção mista (Tabela 4).

Fazendo um paralelo entre a porcentagem de infecção natural nos mosquitos e os resultados observados por frequência relativa observada em Katsuragawa e colaboradores em 2010, que detectaram uma taxa de infecção por PCR em humanos por *P. vivax* de 13,2% e por *P. falciparum* de 1,9%, em estudo feito na região de Candelária, área endêmica para malária em Rondônia.

**Tabela 4. Porcentagem de infecção natural encontrada nos mosquitos por espécie de *Plasmodium* e de *Anopheles* coletados nas áreas de influência da UHE Jirau de abril de 2011 a junho de 2012 e relação com a infecção natural encontrada em humanos em regiões próximas à de estudo**

Espécie	<i>P. vivax</i>	<i>P. falciparum</i>	Mista	Total de infectados	Infecção %	Total
<i>An. darlingi</i>	40	12	4	56	4,2%	1315
<i>An. triannulatus</i>	6	2	0	8	4%	200
<i>An. nuneztovari</i>	2	2	0	4	3,5%	113
<i>An. konderi</i>	4	1	0	5	4,5%	112
<i>An. braziliensis</i>	3	1	1	5	4,6%	108
<b>Total por parasita</b>	55	18	5	78	4,2%	1848
<b>% dos positivos</b>	<b>70,5%</b>	<b>23,1%</b>	<b>6,4%</b>	-	-	-
<b>% do total</b>	2,9%	1%	0,3%	-	-	-
<b>Humanos (Katsuragawa e cols., 2009)</b>	<b>74,8%</b>	<b>18,4%</b>	<b>6,4%</b>	-	-	-

A porcentagem de infecção natural encontrada entre as espécies de *Anopheles* se manteve constante (Tabela 4). Através da análise da significância da diferença entre as espécies (teste-Z) (Tabela 5), não foi detectada diferença estatisticamente significativa entre as proporções.

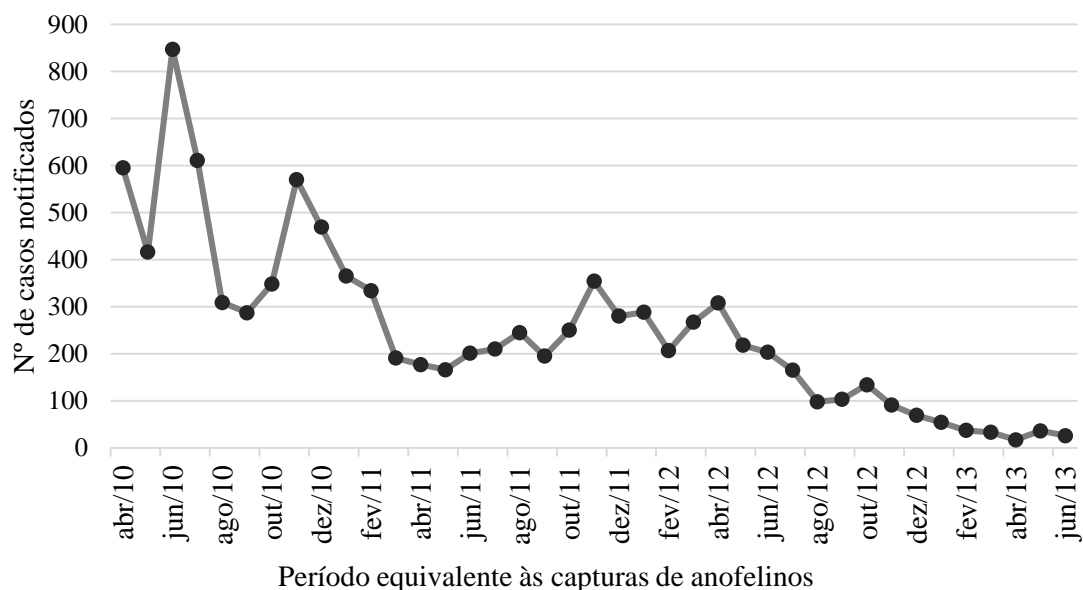
**Tabela 5. Teste Z para análise da taxa de infecção por *Plasmodium* spp. encontrada nas diferentes espécies de *Anopheles* coletados nas áreas de influência da UHE Jirau em Porto Velho-Rondônia de abril de 2011 a junho de 2012**

<b>Espécies</b>	<i>An. triannulatus</i>	<i>An. nuneztovari</i>	<i>An. konderi</i>	<i>An. braziliensis</i>
<i>An. darlingi</i>	z=0,169; p=0,866	z=0,365; p=0,715	z=0,103; p=0,918	z= 0,183; p=0,855
<i>An. braziliensis</i>	z=0,262; p=0,793	z=0,41; p=0,682	z=0,059; p=0,953	
<i>An. konderi</i>	z=0,197; p=0,844	z=0,354; p=0,723		
<i>An. nuneztovari</i>	z=0,204; p=0,838			

É importante notar que quanto menor o número de mosquitos coletados, maior o intervalo de confiança das estimativas (Tabela 6). As espécies com menor abundância apresentam estimativas menos precisas do que aquelas mais abundantes. Dessa forma, a porcentagem de infecção natural geral encontrada nos mosquitos capturados nas proximidades da usina foi de 4,2%. O *An. darlingi* por ser o vetor mais frequente e antropofílico é capaz de manter alta taxa de transmissão. Gil e colaboradores (2007) consideram que a manutenção da doença se dá pela alta taxa de picadas por humano e pelo elevado número de casos assintomáticos na região.

Em geral, os casos de malária vêm caindo no Estado e na região de estudo. A prevalência da malária 12 meses antes (2010/2011) e depois (2012/2013) do estudo e durante os 15 meses (2011/2012) de desenvolvimento do projeto foi demonstrada (Gráfico 5). Os vetores podem se distanciar do local de reprodução de 1,5 a 2 km à procura de hospedeiros, porém podem atingir 5 km de distância utilizando correntes de ar (TADEI e cols, 1988). Os dados de casos de malária aqui apresentados advêm de pontos situados em um raio de 5km do ponto de coleta dos anofelinos do presente estudo. Esses dados foram disponibilizados pelo Laboratório de Epidemiologia do CEPEN, e se encontram disponíveis no banco de dados do SIVEP.

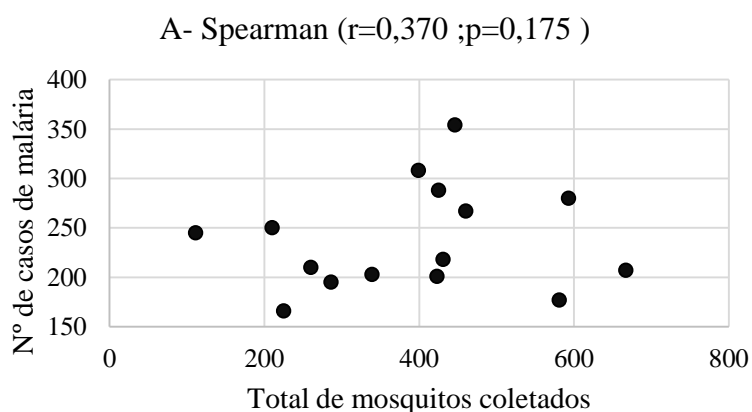
**Gráfico 5. Número de casos de malária notificados na microrregião estudada pertencente às áreas de influência da UHE Jirau em Porto Velho-Rondônia de abril de 2010 a junho de 2013**



**Fonte:** Dados cedidos pelo laboratório de Epidemiologia do CEPEM (2013), disponível no SIVEP

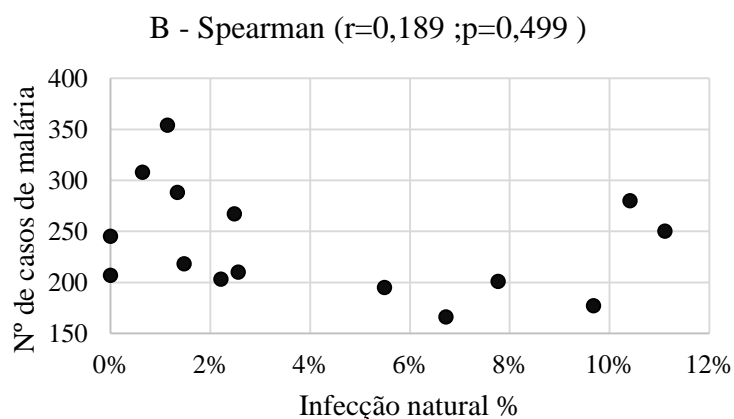
Foi realizada análise (Tabela 6) de correlação não paramétrica (Spearman's  $r = 0,189$ ;  $p = 0,499$ ) entre o número de mosquitos coletados e o número de casos de malária na microrregião (Gráfico 6).

**Gráfico 6. Representação da análise de correlação não-paramétrica entre número de casos de malária na microrregião de estudo e o total de mosquitos coletados**



Também foi realizada análise de correlação entre o número de mosquitos infectados e o número de casos de malária na microrregião (Spearman's  $r = -0,370$ ;  $p = 0,175$ ) (Gráfico 7).

**Gráfico 7. Representação da análise de correlação não-paramétrica entre número de casos de malária na microrregião de estudo e a infecção natural encontrada nos mosquitos**



Não foi observada correlação significativa entre o número de mosquitos coletados com o número de casos de malária, bem como entre os mosquitos infectados e o número de casos de malária, apesar de a taxa de infecção natural ser um dos parâmetros incluídos nos indicadores entomológicos utilizados para monitorar as ações de controle vetorial (BRASIL, Secretaria de Vigilância em Saúde – Controle Vetorial, 2009).

Foi observada importante variação de taxa de infecção natural mensal, independente da quantidade de mosquitos analisados. Provavelmente, em função do caráter hipoendêmico da malária na região em estudo (CAMARGO e cols., 1996), e da grande heterogeneidade dos parâmetros averiguados no presente estudo, para uma eventual detecção de correlação entre o número de casos de malária e a taxa de infecção natural seria necessário um esforço de coleta de mosquitos muito maior, além de maior restrição geográfica das populações humanas investigadas. Ainda, uma continuidade no estudo, permitirá a averiguação de um número maior de mosquitos bem como a importância de fatores sazonais possam ser estudados. Em suma, a heterogeneidade da infecção natural contrasta com a homogeneidade dos casos de malária, o que indica a importância de outros fatores na caracterização epidemiológica da malária na região, como por exemplo medidas de controle de transmissão e de diagnóstico e tratamento precoce de pacientes.

**Tabela 6. Dados utilizados para análise de correlação entre mosquitos coletados, infectados e número de casos de malária notificados na microrregião coletada (área de influência da UHE Jirau) com intervalo de confiança da porcentagem de infecção encontrada, demonstrando os *An. darlingi* coletados, as demais espécies, o total de coletados, averiguados e positivos, além da taxa de infecção natural com seus intervalos de confiança**

Ordem mês	Mês	<i>An. darlingi</i> coletados	Outras espécies coletadas	Todos coletados	Positivos	Analizados	Lim.Inf.I.C. 95%	Infecção (%)	Lim.Sup.I.C. 95%	Proporção Averiguados	Casos de malária*
1	abr/11	555	26	581	12	124	5,10%	9,68%	16,29%	0,21	177
2	mai/11	221	4	225	8	119	2,95%	6,72%	12,82%	0,53	166
3	jun/11	174	249	423	8	103	3,41%	7,77%	14,73%	0,24	201
4	jul/11	238	22	260	2	78	0,31%	2,56%	8,96%	0,30	210
5	ago/11	41	70	111	0	35	-	0,00%	-	0,32	245
6	set/11	256	30	286	5	91	1,81%	5,49%	12,36%	0,32	195
7	out/11	157	53	210	7	63	4,59%	11,11%	21,56%	0,30	250
8	nov/11	365	81	446	1	88	0,03%	1,14%	6,17%	0,20	354
9	dez/11	368	225	593	23	221	6,71%	10,41%	15,21%	0,37	280
10	jan/12	339	86	425	2	149	0,16%	1,34%	4,76%	0,35	288
11	fev/12	570	97	667	0	211	-	0,00%	-	0,32	207
12	mar/12	367	93	460	4	161	0,68%	2,48%	6,24%	0,35	267
13	abr/12	347	52	399	1	157	0,02%	0,64%	3,50%	0,39	308
14	mai/12	373	58	431	2	136	0,18%	1,47%	5,21%	0,32	218
15	jun/12	234	105	339	3	136	0,46%	2,21%	6,31%	0,40	203
16	Total	4605	1251	5856	78	1872	3,31%	4,17%	5,17%	0,32	3569

\*Número de casos de malária nas proximidades da microrregião onde foram coletados os mosquitos (Laboratório de Epidemiologia do CEPEM/RO-2013).



Na comparação entre o presente estudo e diversos trabalhos sobre infecção natural em anofelinos foi observada grande variação entre as taxas de infecção natural, com taxa mínima global de 0,27% e máxima de 8,77% (Tabela 7), considerando para a taxa de infecção máxima, a que possuía o número amostral acima de 100 mosquitos.

Os trabalhos destacados na tabela estão disponíveis no banco de dados NCBI, e como critério de seleção, foram inseridos os trabalhos que avaliaram a infecção natural por *Plasmodium* spp. em espécies de *Anopheles* coletadas em regiões incluídas na Amazônia em toda a América do Sul.

Tabela 7. Revisão de trabalhos realizados na região amazônica com infecção natural por *Plasmodium* spp. em mosquitos do gênero *Anopheles*

Dados do estudo	Espécie mosquito	Nº Analisado	Nº infectado P.v.	Nº infectado P.f.	Nº mista	Total Positivo	Lim.Inf.I.C .95%	Tx. Infecção (%)	Lim.Sup.I.C.9 5%
<b>Autor:</b> Oliveira Ferreira, 1990; <b>Metodologia:</b> ELISA; <b>Local:</b> Rondônia-Brasil; <b>Ano da coleta:</b> 1985-1988	<i>An. darlingi</i>	9885	10	37	-	47	0,35%	0,48%	0,63%
	<i>An. triannulatus</i>	931	5	0	-	5	0,18%	0,54%	1,25%
	<i>An. evansae</i>	376	0	0	-	0	-	0,00%	-
	<i>An. albitarsis</i>	346	2	2	-	4	0,32%	1,16%	2,93%
	<i>An. oswaldoi</i>	288	0	1	-	1	0,01%	0,35%	1,92%
	<i>An. strodei</i>	209	2	0	-	2	0,12%	0,96%	3,41%
	<i>An. braziliensis</i>	142	1	1	-	2	0,17%	1,41%	5,00%
	<i>An. galvaoi</i>	50	0	0	-	0	-	0,00%	-
	<i>An. rangeli</i>	47	0	0	-	0	-	0,00%	-
	<i>An. nuneztovari</i>	15	0	0	-	0	-	0,00%	-
	<i>An. argyritarsis</i>	15	0	0	-	0	-	0,00%	-
	<i>An. mediopunctatus</i>	9	0	0	-	0	-	0,00%	-
	<b>Sub-Total</b>	12313	20	41	0	61	0,38%	0,50%	0,64%
<b>Autor:</b> Corte dos Santos, 2005; <b>Metodologia:</b> ELISA; <b>Local:</b> Pará-Brasil; <b>Ano da coleta:</b> 2002	<i>An. darlingi</i>	372	10	11	0	21	3,53%	5,65%	8,50%
	<i>An. oswaldoi</i>	20	1	0	0	1	0,13%	5,00%	24,87%
	<i>An. nuneztovari</i>	18	1	0	0	1	0,14%	5,56%	27,29%
	<b>Sub-Total</b>	410	12	11	0	23	3,59%	5,61%	8,30%
<b>Autor:</b> Corte dos Santos, 2009; <b>Metodologia:</b> ELISA e Microscopia; <b>Local:</b> Pará-Brasil; <b>Ano da Coleta:</b> 2002	<i>An. darlingi</i>	6350	14	3	0	17	0,16%	0,27%	0,43%
	<i>Outras espécies*</i>	1450	0	0	0	0	-	0,00%	-
	<i>Diversas espécies**</i>	262		12		12	2,39%	4,58%	7,86%
	<b>Sub-Total</b>	8062	26	3	0	29	0,24%	0,36%	0,52%

Continua

## Continuação

Tabela 7. Revisão de trabalhos realizados na região amazônica com infecção natural por *Plasmodium* spp. em mosquitos do gênero *Anopheles*

Dados do estudo	Espécie mosquito	Nº Analisado	Nº infectado P.v.	Nº infectado P.f.	Nº mista	Total Positivo	Lim.Inf.I.C .95%	Tx. Infecção (%)	Lim.Sup.I.C. 95%
<b>Autor:</b> Silva- Vasconcelos, 2002; <b>Metodologia:</b> ELISA; <b>Local:</b> Roraima-Brasil; <b>Ano da coleta:</b> 1996- 1998	<i>An. albitarsis</i>	5987	209	55	17	281	4,19%	4,69%	5,26%
	<i>An. darlingi</i>	730	42	20	2	64	6,91%	8,77%	11,05%
	<i>An. braziliensis</i>	396	6	6	0	12	1,68%	3,03%	5,28%
	<i>An. peryassui</i>	64	0	0	0	0	-	0,00%	-
	<i>An. nuneztovari</i>	38	0	0	0	0	-	0,00%	-
	<b>Sub-Total</b>	7215	257	81	19	357	4,47%	4,95%	5,47%
<b>Autor:</b> Flores-Mendoza, 2004; <b>Metodologia:</b> ELISA; <b>Local:</b> Peru; <b>Ano da coleta:</b> 2001- 2002	<i>An. benarrochi</i>	6323	3	5	1	9	0,07%	0,14%	0,27%
	<i>An. darlingi</i>	1432	4	10	0	14	0,57%	0,98%	1,65%
	<i>An. mattogrossensis</i>	694	0	0	0	0	-	0,00%	-
	<i>An. triannulatus</i>	115	0	0	0	0	-	0,00%	-
	<i>An. oswaldoi</i>	73	0	0	0	0	-	0,00%	-
	<i>An. rangeli</i>	47	0	0	0	0	-	0,00%	-
	<i>An. peryassui</i>	55	0	0	0	0	-	0,00%	-
	<i>An. forattini</i>	38	0	0	0	0	-	0,00%	-
	<i>An. nimbus</i>	15	0	0	0	0	-	0,00%	-
	<i>An. albitarsis</i>	5	0	0	0	0	-	0,00%	-
	<i>An. intermedius</i>	11	0	0	0	0	-	0,00%	-
	<i>An. nuneztovari</i>	3	0	0	0	0	-	0,00%	-
	<i>An. fluminesis</i>	4	0	0	0	0	-	0,00%	-
	<b>Sub-Total</b>	8815	7	15	1	23	0,17%	0,26%	0,39%

## Continuação

Tabela 7. Revisão de trabalhos realizados na região amazônica com infecção natural por *Plasmodium* spp. em mosquitos do gênero *Anopheles*

Dados do estudo	Espécie mosquito	Nº Analisado	Nº infectado P.v.	Nº infectado P.f.	Nº mista	Total Positivo	Lim.Inf.I.C .95%	Tx. Infecção (%)	Lim.Sup.I.C. 95%
<b>Autor:</b> Quiñones, 2006; <b>Metodologia:</b> ELISA; <b>Local:</b> Colômbia; <b>Ano da coleta:</b> 2000-2001	<i>An. benarrochi</i>	1617	0	-	-	0	-	0,00%	-
	<i>An. rangeli</i>	413	35	-	-	35	6,13%	8,47%	11,58%
	<i>An. oswaldoi</i>	362	1	-	-	1	0,01%	0,28%	1,71%
	<i>An. darlingi</i>	29	0	-	-	0	-	0,00%	-
	<i>An. mattogrossensis</i>	7	0	-	-	0	-	0,00%	-
	<i>An. neomaculipalpus</i>	7	0	-	-	0	-	0,00%	-
	<i>An. triannulatus</i>	6	0	-	-	0	-	0,00%	-
	<i>An. apicimacula</i>	2	0	-	-	0	-	0,00%	-
	<i>An. punctimacula</i>	1	0	-	-	0	-	0,00%	-
	<i>An. peryassui</i>	1	0	-	-	0	-	0,00%	-
	<b>Sub-Total</b>	2445	36	-	-	36	1,06%	1,47%	2,04%
<b>Autor:</b> Gil, 2007; <b>Metodologia:</b> Microscopia; <b>Local:</b> Rondônia-Brasil; <b>Ano da coleta:</b> 2001-2004	<i>An. darlingi</i>	2710	-	-	-	8	0,13%	0,30%	0,58%
	<i>An. konderi</i>	56	-	-	-	0	-	0,00%	-
	<i>An. nuneztovari</i>	29	-	-	-	0	-	0,00%	-
	<i>An. triannulatus</i>	25	-	-	-	0	-	0,00%	-
	<i>An. evansae</i>	9	-	-	-	0	-	0,00%	-
	<i>An. mattogrossensis</i>	3	-	-	-	0	-	0,00%	-
	<i>An. mediopunctatus</i>	3	-	-	-	0	-	0,00%	-
	<i>An. rangeli</i>	1	-	-	-	0	-	0,00%	-
	<b>Sub-Total</b>	2836	-	-	-	8	0,12%	0,28%	0,56%

## Continuação

Tabela 7. Revisão de trabalhos realizados na região amazônica com infecção natural por *Plasmodium* spp. em mosquitos do gênero *Anopheles*

Dados do estudo	Espécie mosquito	Nº Analisado	Nº infectado P.v.	Nº infectado P.f.	Nº mista	Total Positivo	Lim.Inf.I.C .95%	Tx. Infecção (%)	Lim.Sup.I.C. 95%
<b>Autor:</b> Tadei, 2000; <b>Metodologia:</b> ELISA; <b>Local:</b> Amazonas- Brasil; <b>Ano da coleta:</b> 1994-1998	<i>An. darlingi</i>	5784	75	30	19	124	1,79%	2,14%	2,55%
	<i>An. nuneztovari</i>	3308	57	22	10	89	2,17%	2,69%	3,30%
	<i>An. albitarsis</i>	1904	19	14	6	39	1,46%	2,05%	2,79%
	<i>An. triannulatus</i>	519	19	4	2	25	3,14%	4,82%	7,03%
	<i>An. mattogrossensis</i>	152	3	1	0	4	0,72%	2,63%	6,60%
	<i>An. braziliensis</i>	128	2	0	1	3	0,49%	2,34%	6,70%
	<i>An. mediopunctatus</i>	77	1	0	0	1	0,03%	1,30%	7,03%
	<i>An. peryassui</i>	6	0	0	1	1	0,42%	16,67%	64,12%
	<b>Sub-Total</b>	11878	176	71	39	286	2,14%	2,41%	2,70%
<b>Presente estudo;</b> <b>Metodologia:</b> PCR; <b>Local:</b> Rondônia-Brasil; <b>Ano da coleta:</b> 2011- 2012	<i>An. darlingi</i>	1315	40	12	4	56	3,23%	4,26%	5,50%
	<i>An. triannulatus</i>	200	6	2	0	8	1,74%	4,00%	7,73%
	<i>An. nuneztovari</i>	113	2	2	0	4	0,97%	3,54%	8,82%
	<i>An. konderi</i>	112	4	1	0	5	1,47%	4,46%	10,11%
	<i>An. braziliensis</i>	108	3	1	1	5	1,52%	4,63%	10,47%
	<i>An. deaneorum</i>	11	0	0	0	0	-	0,00%	-
	<i>An. costai</i>	7	0	0	0	0	-	0,00%	-
	<i>An. mattogrossensis</i>	5	0	0	0	0	-	0,00%	-
	<i>An. pseudotibiamaculatus</i>	1	0	0	0	0	-	0,00%	-
	<b>Sub-Total</b>	1872	55	18	5	78	3,31%	4,17%	5,17%

## Conclusão

**Tabela 7. Revisão de trabalhos realizados na região amazônica com infecção natural por *Plasmodium* spp. em mosquitos do gênero *Anopheles***

Dados do estudo	Espécie mosquito	Nº Analisado	Nº infectado P.v.	Nº infectado P.f.	Nº mista	Total Positivo	Lim.Inf.I.C .95%	Tx. Infecção (%)	Lim.Sup.I.C. 95%
Conjunto dos trabalhos	<i>An. darlingi</i>	28607	195	123	25	343	1,08%	1,20%	1,33%
	Outras espécies*	26977	382	117	39	538	1,83%	1,99%	2,17%
	<b>Total</b>	55584	577	240	64	881	1,48%	1,58%	1,69%

Lim.Inf.I.C.95% - Limite inferior do intervalo de confiança da proporção utilizando o método modificado de Wald; Prop. Infecção(%) -proporção de mosquitos positivos para qualquer espécie de *Plasmodium* sobre o total de mosquitos investigados; Lim.Sup.I.C.95% - Limite superior do intervalo de confiança da proporção utilizando o método modificado de Wald.\*Outras espécies fora *An. darlingi*; \*\*Diversas espécies incluindo *An. darlingi* e positivo para espécies de *Plasmodium*; PV=*P. vivax*; PF=*P. falciparum*

No estudo comparativo entre os diversos trabalhos, é possível verificar grande diversidade de espécies de *Anopheles* infectadas com *Plasmodium* spp., além de grande variação nas taxas de infecção natural. Diferenças na metodologia utilizada, região onde foram capturados os mosquitos e diferentes desenhos experimentais de cada estudo podem estar relacionados com a variação observada. Um fator importante é que alguns estudos não falam com clareza da incidência da malária na microrregião estudada no período de captura, o que gera falta de consistência no trabalho como um todo.

Quanto à frequência das espécies pode-se observar que o *An. darlingi* é o mais abundante em vários estudos, ou se apresenta como a segunda espécie mais frequente, dependendo da região do estudo.

No estudo de Quiñones e colaboradores (2006) na Colômbia, foi observada maior prevalência de *An. benarrochi*, seguido de *An. rangeli* e *An. oswaldoi*. Este estudo incrimina as espécies infectadas por *Plasmodium* spp., *An. rangeli* e *An. oswaldoi*, como potenciais vetoras da malária.

No Peru, Flores-Mendoza e colaboradores (2004) também capturaram mais mosquitos da espécie *An. benarrochi*, porém *An. darlingi* foi a segunda espécie mais frequente, sendo somente as duas infectadas por *Plasmodium* spp. A infecção em *An. darlingi* (0,98%) foi maior que em *An. benarrochi* (0,14%) indicando que ambos exercem papel importante na transmissão da malária no local, por terem se mostrado vetores competentes, abundantes na região e antropofílicos.

Silva-Vasconcelos e colaboradores (2002), capturaram em Roraima oito vezes mais *An. albitarsis* (5987) do que *An. darlingi* (730), apresentando, além destas espécies, *An. braziliensis* infectado (3%).

Tadei (2000) capturou um número expressivo de espécimes (11878), a maior parte de *An. darlingi* (5784), seguida de *An. nuneztovari* (3308) e *An. albitarsis* (1904) em um período de 4 anos de coleta. A taxa de infecção se manteve em cerca de 2% na maioria das espécies.

Dos estudos realizados em Rondônia (Oliveira-Ferreira e cols., 1990; Gil e cols., 2007 e o presente estudo), o que obteve maior taxa de infecção natural foi o presente, e ambos capturaram mais mosquitos da espécie *An. darlingi*. No estudo de Oliveira-Ferreira (1990) a infecção foi maior em *An. braziliensis* (1,41%), porém o seu número amostral foi pequeno (142), enquanto foram capturados 9885 *An. darlingi* com infecção de 0,48%. Apesar do longo período de coleta, Gil e colaboradores capturaram poucos

mosquitos das demais espécies (126) com relação aos outros estudos, encontrando apenas o *An. darlingi* infectado, onde a técnica utilizada foi a microscopia.

Dos estudos realizados no Pará (Corte-dos-Santos e cols., 2005; 2009), o do ano de 2005 apresentou taxa de infecção mais semelhante à do presente estudo, porém foi realizado por ELISA. O estudo de 2009 apresentou taxa semelhante ao estudo de Gil em 2007, e também foi feita a investigação pela técnica de microscopia.

Com base nesses dados podemos verificar que a quantidade de *Anopheles darlingi* contribui para a manutenção da transmissão da doença nessas áreas, porém as demais espécies também são epidemiologicamente importantes na transmissão da malária, pois, de acordo com os resultados de infecção natural, espécies como *An. albitarsis*, *An. braziliensis*, *An. nuneztovari* e *An. triannulatus*, no Brasil, *An. benarrochi* no Peru e *An. rangeli* e *An. oswaldoi* na Colômbia, podem estar participando da transmissão da malária e apresentam competência vetorial assim como o *An. darlingi*.

Esta comparação mostra a diversidade de espécies presentes em regiões amazônicas bem como as espécies de *Anopheles* que se mostram competentes como vetoras, ou seja, se encontram infectadas pelo parasita, mostrando que tem competência para se tornar um potencial vetor capaz de infectar o hospedeiro (CONSOLI E LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

A competência vetorial está provavelmente relacionada com características genéticas, fisiológicas e imunológicas da espécie de mosquito para adquirir e transmitir o patógeno com eficiência (REISEN e cols., 1993). Já a capacidade de transmitir o patógeno está associada à longevidade, frequência de alimentação em humanos, densidade de mosquitos, entre outros fatores (ZIMMERMAN, 1992). A antropofilia é um fator importante para que os vetores competentes sejam capazes de transmitir a doença (BARROS e cols., 2010).

Para uma análise completa dos impactos das usinas, deve-se realizar comparações entre coletas pré, durante e pós-construção para obtenção de dados reais sobre o impacto na fauna local, evitando variações que possam levar à estimativas com pouca precisão sobre o que de fato está ocorrendo com a população de mosquitos.

Seria importante haver maior convergência metodológica entre os estudos de áreas de influência tanto no que se refere a detecção do *Plasmodium* spp. no mosquito, quanto no esforço, metodologia e localização das coletas, que permitiria maior comparabilidade dos estudos.



## 5. CONCLUSÕES

O presente estudo está associado ao monitoramento de vetores de importância médica realizado pelo IPEPATRO e Fiocruz Rondônia para a ESBR, empresa responsável pela construção da UHE Jirau e pelas providências de controle a serem tomadas no local.

O levantamento das espécies de anofelinos e a avaliação da infecção natural foi realizada com o objetivo de avaliar a dinâmica da transmissão e fornecer suporte entomológico na continuidade da implementação de medidas de controle da malária na área estudada, demonstrando a densidade de anofelinos na área de estudo e as espécies infectadas com o patógeno.

A detecção de espécies de *Plasmodium* spp. em potenciais vetores é um dos principais parâmetros analisados para um estudo completo de controle e monitoramento da malária (BARBOSA & SOUTO, 2013), estimando através da taxa de infecção natural a intensidade da transmissão da doença e incriminando espécies vetorais (MAHAPATRA e cols., 2006). A incriminação do vetor é pré-requisito para entender o papel dos anofelinos na transmissão da malária e para determinar as espécies que merecem mais atenção na região (GALARDO e cols., 2007).

Do ponto de vista qualitativo é indicativo importante o fato de encontrarmos *An. darlingi* e outras espécies de anofelinos infectados, demonstrando a competência vetorial de outras espécies presentes na região. Porém, visando estabelecer uma relação quantitativa precisa entre taxa de infecção natural dos mosquitos com a incidência de malária, a grande variação nos dados observados deixam claro que seria necessário estabelecer um desenho experimental mais robusto, incluindo maior número de coletas e por um período mais longo de seguimento, para que as variações pontuais, bem como variações sazonais e tendências de queda na malária possam ser devidamente averiguadas, trazendo conclusões mais claras sobre a relação entre taxa de infecção nos mosquitos e casos humanos de malária.

O período de 15 meses de estudo pode ter sido curto para chegarmos a uma conclusão sobre a taxa de infecção natural de cada espécie de *Anopheles* presente na região de estudo. Não foi observada diferença significativa entre as taxas de infecção, porém o *An. darlingi* foi o mais abundante em todos os meses de coleta.

Há necessidade de esforço de vigilância entomológica com um maior tempo de estudo na região e quantidade maior de mosquitos coletados para que se possa averiguar

com mais precisão a relação entre fatores como taxa de infecção natural do mosquito ou a própria abundância dos mosquitos com o número de casos de malária em determinada região.

## 6. REFERÊNCIAS

- ANDRADE, B. B.; REIS-FILHO, A.; SOUZA-NETO, S. M.; CLARÊNCIO, J.; CAMARGO, L. M. A.; BARRAL, A.; BARRAL-NETO, M. Severe *Plasmodium vivax* malária exhibits marked inflammatory imbalance. **Malaria Journal**, 2010.
- AREZ, A.P.; LOPES, D.; PINTO, J.; FRANCO, A.S.; SNOUNOU, G.; ROSÁRIO, V.E. *Plasmodium* sp.: Optimal protocols for PCR detection of low parasite numbers from mosquito (*Anopheles* sp.) samples. **Experimental Parasitology**, v. 94, 2000.
- BARBOSA, L. M. C.; SOUTO, R. N. P. Infectividade natural em *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *albitarsis* s.l. Galvão e Damasceno, 1942 e *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *darlingi* Root, 1926 em áreas úmidas da cidade de Macapá, Amapá, Brasil. **Biota Amazônia**, v. 3, 2013.
- BARROS, F.S.M.; HONÓRIO, N.A.; ARRUDA, M.E. Mosquito anthropophily: Implications on malaria transmission in the Northern Brazilian Amazon. **Neotropical Entomology**, v. 36, 2010.
- BICUDO-DE-PAULA, M.; GOMES, A. C. Culicidae (Diptera) em área sob influência de construção de represa no Estado de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, v. 41, 2007.
- BRAGA, E. M. & FONTES, C. J. F. Plasmodium – Malária. In: NEVES, David Pereira. **Parasitologia Humana**, 11ª edição, cap. 17, Editora Atheneu, 2005.
- BRASIL, **DataSUS** – Indicadores de Saúde. Disponível em: [datasus.saude.gov.br](http://datasus.saude.gov.br).
- BRASIL, Manual de Diagnóstico Laboratorial de Malária. Série A. Normas e Manuais Técnicos, **Ministério da Saúde**, 2005.
- BRASIL, **Portal Brasil**, 2014. Disponível em: [www.portalbrasil.gov.br](http://www.portalbrasil.gov.br)
- BRASIL, Prefeitura do Município de Porto Velho. **Plano de Ação de Controle da Malária nas Áreas de Influência da UHE St Antônio em Porto Velho**. Secretaria Municipal de Saúde, 2012.
- BRASIL, Secretaria de Vigilância em Saúde – **Controle Vetorial**, 2009.
- BRASIL, Secretaria de Vigilância em Saúde – **Plano de Ação de Controle da malária**. Ministério da Saúde, 2008.
- BRASIL. **Ministério da Saúde**. 2013.
- BRASIL. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Relatório de situação: Rondônia, 5ª ed., **Ministério da Saúde**, 2011.
- CALDERÓN, G.; FERNÁNDEZ, R.; VALLE, J. Especies de la fauna anofelina, su distribución y algunas consideraciones sobre su abundancia e infectividad en el Peru. **Revista Peruana de Epidemiología**, 1995.

CAMARGO, L.M.; DAL COLLETO, G.M.; FERREIRA, M.U.; GURGEL S. DE M.; ESCOBAR, A.L.; MARQUES, A.; KRIEGER, H.; CAMARGO, E.P.; DA SILVA, L.H. Hypoendemic malaria in Rondonia (Brazil, western Amazon region): seasonal variation and risk groups in an urban locality. **Am J Trop Med Hyg**, v. 55, 1996.

CDC - **Centers for Disease Control and Prevention** – Malária Life Cycle, 2014.

CLOPPER, C. J.; PEARSON, E. S. The use of confidence or fiducial limits illustrated in the case of the binomial. **Biometrika**, v. 26, 1934.

CONN, J.E.; MORENO, M.; SAAVEDRA, M.; BICKERSMITH, S.A.; KNOLL, E.; FERNANDEZ, R.; VERA, H.; BURRUS, R.G.; LESCANO, A.G.; SANCHEZ, J.F.; RIVERA, E.; VINETZ, J.M. Short Report: Molecular taxonomy of *Anopheles* (Nyssorhynchus) *benarrochi* (Diptera: Culicidae) and malaria epidemiology in Southern Amazonian Peru. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, 2013.

CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Editora FioCruz, Rio de Janeiro, 1994.

CORTE-DOS-SANTOS, R. L.; PADILHA, A.; COSTA, M. D. P.; COSTA, E. M.; DANTAS-FILHO, H. C.; PÓVOA, M. M. Vetores de malária em duas reservas indígenas da Amazônia brasileira. **Revista de Saúde Pública**, v. 43, 2009.

CORTE-DOS-SANTOS, R. L.; SUCUPIRA, I. M. C.; LACERDA, R. N. L.; FAYAL, A. S.; PÓVOA, M. M. Inquérito entomológico e infectividade durante epidemia de malária no município de najás, Estado do Pará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, 2005.

DEANE, LEONIDAS M. Malaria Vectors in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, 1986.

EIRAS, ÁLVARO EDUARDO. Culicidae. In: NEVES, DAVID PEREIRA. **Parasitologia Humana**, 11ª edição, cap. 43, Editora Atheneu, 2005.

ELDRIDGE, BRUCE F. Mosquitoes, the Culicidae. In: MARQUARDT, W. C. **Biology of Disease Vectors**, 2ª edição, cap. 9, Editora Elsevier, 2004.

ESBR – ENERGIA SUSTENTÁVEL DO BRASIL. Usina Hidrelétrica Jirau é registrada nas Nações Unidas. Disponível em <https://www.energiasustentaveldobrasil.com.br>, 2013.

FAIRLEY, T.L.; PÓVOA, M.M.; CONN, J.E. Evaluation of the Amazon River delta as a barrier to gene flow for the regional malaria vector, *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae) in northeastern Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 39, 2002.

FERRETE, Jaqueline Aida. **Fauna anofélica da área de construção da barragem da usina hidrelétrica Amador Aguiar I, na bacia do rio Araguari no município de Uberlândia, MG**. Tese de Doutorado, Programa de Pós-graduação em Geografia da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – Minas Gerais, 2009.

FLORES-MENDOZA, C.; FERNÁNDEZ, R.; ESCOBELLO-VARGAS, K.S.; VELA-PEREZ, Q.; SCHOELER, G. Natural *Plasmodium* infections in *Anopheles darlingi* and *Anopheles benarrochi* (Diptera: Culicidae) from Eastern Peru. **Journal of Medical Entomology**, v. 41, 2004.

FORATTINI, OSWALDO PAULO. **Culicidologia Médica**, v. 2, Editora EdUSP, 2002.

FUGIKAHARA, E.; FORNAZARI, P. A.; PENHALBEL, R. S. R.; LORENZETTI, A.; MAROSO, R. D.; AMORAS, J. T.; SARAIVA, A. S.; SILVA, R. U.; BONINI-DOMINGOS, C. R.; MATTOS, L. C.; ROSSIT, A. R. B.; CAVASINI, C. E.; MACHADO, R. L. D. Molecular screening of *Plasmodium* sp. asymptomatic carriers among transfusion centers from Brazilian Amazon region. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 2007.

GALARDO, A.K.R.; ARRUDA, M.; COUTO, A.A.R.D.; WIRTZ, R.; LOUNIBOS, P.; ZIMMERMAN, R.H. Malaria vector incrimination in three rural riverine villages in the Brazilian Amazon. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, 2007.

GIL, L. H. S.; TADA, M. S.; KATSURAGAWA, T. H.; RIBOLLA, P. E. M.; PEREIRA-DA-SILVA, L. H. Urban and suburban malária in Rondônia (Brazilian Western Amazon) II. Perennial transmissions with high anopheline densities are associated with human environmental changes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, 2007.

HARRIS, A.F.; MATIAS-ARNÉZ, A.; HILL, N. Biting time of *Anopheles darlingi* in the Bolivian Amazon and implications for control of malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, 2006.

HIWAT-VAN LAAR, H. Malaria in Suriname: A new era. Impact of modified intervention strategies on *Anopheles darlingi* populations and malaria incidence. **Tese. Wageningen University**, Wageningen, NL, 2011.

KAPPE, S. H. I.; KAISER, K.; MATUSCHEWSKI, K. The *Plasmodium* sporozoite journey: a rite of passage. **Trends in Parasitology**, v. 19, 2003.

KATSURAGAWA, T. H.; CUNHA, R. P. A.; APOLUCENO-DE-SOUZA, D. C.; GIL, L. H. S.; CRUZ, R. B.; ALMEIDA-E-SILVA, A.; TADA, M. S.; PEREIRA-DA-SILVA, L. H. P. Malária e aspectos hematológicos em moradores da área de influência dos futuros reservatórios das hidrelétricas de Santo Antônio e Jirau, Rondônia, Brasil. **Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro**. v. 25, 2009.

KATSURAGAWA, T. H.; GIL, L. H. S.; TADA, M. S.; ALMEIDA-E-SILVA, A.; COSTA, J. D. N.; ARAÚJO, M. S.; ESCOBAR, A. L.; PEREIRA-DA-SILVA, L. H. The dynamics of transmission and spatial distribution of malária in Riverside areas of Porto Velho, Rondônia, in the Amazon region of Brazil. **PlosOne**, 2010. v. 5, 2010.

KLEIN, T. A.; LIMA, J. B. P.; TADA, M. S. Comparative susceptibility of anopheline mosquitoes to *Plasmodium falciparum* in Rondônia, Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 44, 1991.

KLEIN, T.A.; LIMA, J.P; TADA, M.S.; MILLER, R. Comparative susceptibility of anopheline mosquitoes in Rondonia, Brazil to infection with *Plasmodium vivax*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 45, 1991.

LACERDA, M. V. G.; FRAGOSO, S. C. P.; ALECRIM, M. G. C.; ALEXANDRE, M. A. A.; MAGALHÃES, B. M. L.; SIQUEIRA, A. M.; FERREIRA, L. C. L.; ARAÚJO, J. R.; MOURÃO, M. P. G.; FERRER, M.; CASTILLO, P.; MARTIN-JAULAR, L.; FERNANDEZ-BECERRA, C.; DEL-PORTILLO, H.; ORDI, J.; ALONSO, P. L.; BASSAT, Q. Postmortem Characterization of patients with clinical diagnosis of Plasmodium vivax malária: to what extent does this parasite kill? **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, 2012.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; GUIMARÃES, A. E. G.; ARLÉ, M.; FERNANDES-DA-SILVA, T.; CASTRO, M. G.; MOTTA, M. A.; DEANE, L. M. Anopheline species, some of their habits and relation to malária in endemic áreas of Rondônia state, Amazon region of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 4, 1989.

MAHAPATRA, N.; MARAI, N.S.; RANJIT, M.R.; PARIDA, S.K.; HANSDAH, D.P.; HAZRA, R.K.; KAR, S.K. Detection of *Plasmodium falciparum* infection in *Anopheles* mosquitoes from Keonjhar district, Orissa, India. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 43, 2006.

MARTINS, Régia de Lourdes Ferreira Pachêco. **Criadouros de Anopheles e a ocorrência da malária na zona urbana de Porto Velho, Rondônia**. Dissertação de Mestrado. Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, FioCruz, 2010.

MASCARENHAS, B.M.; GUIMARÃES, D.G.; BRÍGIDA, M.S.; PINTO, C.S.; GOMEZ NETO, H.A.; PEREIRA, J.D.B. Estudo de anofelinos antropofílicos peridomiciliares da Praia da Saudade na Ilha de Cotijuba: uma área endêmica de malária em Belém, Pará. **Acta Amazônica**, v. 39, 2009.

MONTEIRO, M. R. C. C.; RIBEIRO, M. C.; FERNANDES, S. C. Aspectos clínicos e epidemiológicos da malária em um hospital universitário de Belém, Estado do Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 4, 2013.

MORENO, J.E.; RUBIO-PALIS, Y.; PÁEZ, E.; SÁNCHEZ, V. Abundance, biting behaviour and parous rate of Anopheline mosquito species in relation to malaria incidence in gold-mining areas of southern Venezuela. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 21, 2007.

MORENO, M.; CANO, J.; NZAMBO, S.; BOBUAKASI, L.; BUATICHE, J. N.; ONDO, M.; MICHA, F.; BENITO, A. Malaria Panel Assay versus PCR: detection of naturally infected *Anopheles melas* in a coastal village of Equatorial Guinea. **Malaria Journal**, v. 3, 2004.

MUCCI, Luis Felipe. **Ecologia de *Anopheles darlingi* Root (1926) no reservatório de Porto Primavera, Estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul**. Tese de Doutorado, Pós-Graduação em Saúde Pública, Faculdade de Saúde Pública, São Paulo, 2008.

OHRT, C.; PURNOMO; SUTAMIHARDJA, M.A.; TANG, D.; KAIN, KC. Impacto f microscopy error on etimates of protective efficacy in malária-prevention trials. **The jornal of Infectious Diseases**, v. 186, 2002.

OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; TEVA, A.; DEANE, L. M.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. Natural malária infections in anophelines in Rondônia state, Brazilian Amazon. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 43, 1990.

PINEDO-CANCINO, V.; SHEEN, P.; TARAZONA-SANTOS, E.; OSWALD, W.E.; JERI, C.; VITTOR, A.Y.; PATZ, J. A.; GILMAN, R.H. Limited diversity of *Anopheles darlingi* in the Peruvian Amazon region of Iquitos. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, 2006.

PÓVOA, M. M.; LESSA-DE-SOUZA, R. T.; LACERDA, R. N. L.; ROSA, E. S.; GALIZA, D.; RODRIGUES-DE-SOUZA, J.; WIRTZ, R. A.; SCHLICHTING, C. D.; CONN, J. E. The importance of *Anopheles albitarsis* E and *An. darlingi* in human malária transmission in Boa Vista, state of Roraima, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, 2006.

QUIÑONES, M.L.; RUIZ, F.; CALLE, D.A.; HARBACH, R.E.; ERAZO, H.F.; LINTON, Y.M. Incrimination of *Anopheles* (Nyssorhynchus) *rangeli* and *An. (Nys.) oswaldoi* as natural vectors of *Plasmodium vivax* in Southern Colombia. **Memórias do Intituto Oswaldo Cruz**, v. 101, 2006.

REISEN, W.K.; PRADHAN, S.P.; SHRESTHA, J.P.; SHRESTHA, S.L.; VAIDYA, R.G.; SHRESTHA, J.D. Anophelinae mosquito (Diptera: Culicidae) ecology in relation to malaria transmission in the inner and Outer Terai of Nepal, 1987-1989. **Journal of Medical Entomology**, v. 30, 1993.

REZENDE, H. R.; SOARES, R. M.; CERUTTI-JR, C.; ALVES, I. C.; NATAL, D.; URBINATTI, P. R.; YAMASAKI, T.; FALQUETO, A.; MALAFRONTA, R. S. Entomological Characterization and natural infection of Anophelines in an Area of the Atlantic Forest with autochthonous Malaria cases in mountainous region of Espírito Santo state, Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 38, 2009.

ROSA-FREITAS, M. G.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; CARVALHO-PINTO, C. J.; FLORES-MENDOZA, C.; SILVA-DO-NASCIMENTO, T. F. Anopheline species complexes in Brazil. Current knowledge of those related to malária transmission. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, 1998.

ROSENBERG, R.; BEARD, C. B. Vector-borne Infections. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, 2011.

SCOPEL, K. K. G.; FONTES, C. J. F.; NUNES, A. C.; HORTA, M. F.; BRAGA, E. M. Low sensitivity of nested PCR using Plasmodium DNA extracted from stained thick blood smears: an epidemiological retrospective study among subjects with low parasitemia in an endemic area of the Brazilian Amazon region. **Malaria Journal**, v. 3, 2004.

SILVA-VASCONCELOS, A.; KATÓ, M.Y.N; MOURÃO, E.N.; SOUZA, R.T.L.; LACERDA, R.N.L.; SIBAJEV, A.; TSOURIS, P.; PÓVOA, M.M.; MOMEN, H.; ROSA-FREITAS, M.G. Biting indices, Host-seeking activity and natural infection rates of anopheline species in Boa Vista, Roraima, Brazil from 1996 to 1998. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, 2002.

SNOUNOU, Georges. Detection and identification of the four malaria parasite species infecting humans by PCR amplification. **Methods Mol. Biol.**, v. 50, 1996.

SOUZA-SANTOS, R. Distribuição sazonal de vetores da malária em Machadinho d'Oeste, Rondônia, Região Amazônica, Brasil. **Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro**, 2002.

STEENKESTE, N.; INCARDONA, S.; CHY, S.; DUVAL, L.; EKALA, M.; LIM, P.; HEWITT, S.; SOCHANATHA, T.; SOCHEAT, D.; ROGIER, C.; MERCEREAU-PUJALON, O.; FANDEUR, T.; ARIEY, F. Towards high-throughput molecular detection of *Plasmodium*: new approaches and molecular markers. **Malaria Journal**, v. 8, 2009.

TADEI, W. P.; MENDES-DOS-SANTOS, J. M.; COSTA, W. L. S.; SCARPASSA, V. M. Biologia de anofelinos amazônicos. XII. Ocorrência de espécies de *Anopheles*, dinâmica da transmissão e controle da malária na zona urbana de Ariquemes – Rondônia. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 1988.

TADEI, W. P.; THATCHER, B. D. Malaria vectors in the Brazilian Amazon: *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 42, 2000.

TAIPE-LAGOS, C. B.; NATAL, D. Abundância de culicídeos em área metropolitana preservada e suas implicações epidemiológicas. **Revista de Saúde Pública**, v. 3, 2003.

TURELL, J.M.; SARDELIS, M.R.; JONES, J.W.; WATTS, D.M.; FERNANDEZ, R.; CARBAJAL, F.; PECOR, J.E.; KLEIN, T.A. Seasonal distribution, biology, and human attraction patterns of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in a rural village and adjacent forested site near Iquitos, Peru. **Journal of Medical Entomology**, v. 45, 2008.

WANDERLEY, D. M. V.; REHDER-DE-ANDRADE, J. C.; MENEGUETTI, L. C.; CHINELATTO, M. J.; DUTRA, A. P. Malária no Estado de São Paulo, Brasil, 1980 a 1983. **Revista de Saúde Pública**, v. 19, 1985.

WHO - World Health Organization. Guidelines on the elimination of residual foci of malária, 2007.

WHO - World Health Organization. World Malaria Report, 2013.

ZAPATA, M.A.; CIENFUEGOS, A.V.; QUIRÓS, O.I.; QUIÑONES, M.L.; LUCKHART, S.; CORREA, M.M. Discrimination of seven *Anopheles* species from San Pedro de Urabá, Antioquia, Colombia, by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of its sequences. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, 2007.



ZIMMERMAN, R.H. Ecology of malaria vectors in the Americas and future direction. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, 1992.

## APÊNDICE I

### PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS UTILIZADOS

#### Protocolo de extração de DNA

NaOH a 1M	20µl
Macerar com pistilo autoclavado	
Banho-seco a 80°C por 10 minutos	
Resfriar no gelo	
Tris HCl a 0,2M pH7,5	180µl
Homogeneizar	
Centrifugar a 1500rpm por 2 minutos	
5µl para PCR	

#### Protocolo da PCR Nested 1 – Gênero *Plasmodium spp*

Reagentes	Concentração final	Volume / 1 reação
Água autoclavada	-	13,2 µl
Tampão 10X	1X	2 µl
MgCl <sub>2</sub>	1,5mM	0,6 µl
dNTP	0,2mM cada	1 µl
Primer rPlu5 sense	0,5µM	1,5 µl
Primer rPlu6 anti-sense	0,5µM	1,5 µl
Taq DNA Polimerase	1 U	0,2 µl
DNA	-	5 µl
<b>Volume Final</b>		<b>25 µl</b>

#### Protocolo da PCR Nested 2 - *P. vivax*

Reagentes	Concentração	Volume / 1 reação
Água autoclavada	-	13,2 µl
Tampão 10X	1X	2 µl
MgCl <sub>2</sub>	1,5mM	0,6 µl
dNTP	0,2mM cada	1 µl
Primer rViv1 sense	0,5µM	1,5 µl
Primer rViv2 anti-sense	0,5µM	1,5 µl
Taq DNA Polimerase	1 U	0,2 µl
DNA	-	5 µl
<b>Volume Final</b>		<b>25 µl</b>

**Protocolo da PCR Nested 2 - *P. falciparum***

<b>Reagentes</b>	<b>Concentração</b>	<b>Volume / 1 reação</b>
Água autoclavada	-	13,2 µl
Tampão 10X	1X	2 µl
MgCl <sub>2</sub>	1,5mM	0,6 µl
dNTP	0,2mM cada	1 µl
Primer rFal1 sense	0,5µM	1,5 µl
Primer rFal2 anti-sense	0,5µM	1,5 µl
Taq DNA Polimerase	1 U	0,2 µl
DNA	-	5 µl
<b>Volume Final</b>		<b>25 µl</b>

**Condições de temperatura para PCR**

<b>Condição</b>	<b>Nested 1 - gênero</b>		<b>Nested 2 – <i>P. vivax</i></b>		<b>Nested 2 – <i>P. falciparum</i></b>	
Desnaturação Inicial	94°C - 3'		94°C - 3'		94°C - 3'	
Desnaturação	94°C - 45''		94°C - 45''		94°C - 45''	
Anelamento	56°C - 1'	25 X	56°C - 1'	30 X	60°C - 1'	30 X
Extensão	72°C - 2'		72°C - 2'		72°C - 2'	
Extensão Final	72°C - 5'		72°C - 5'		72°C - 5'	

## APÊNDICE II

RESUMO APRESENTADO NO XXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE  
PARASITOLOGIAInfecção natural em vetores da malária nas áreas de influência da usina  
hidrelétrica de Jirau em RondôniaIasmin Ferreira Pimentel <sup>1,2</sup>Alexandre de Almeida e Silva <sup>1,2</sup>Luiz Herman Soares Gil <sup>1</sup>Ricardo de Godoi Mattos Ferreira <sup>1</sup><sup>1</sup> Fundação Oswaldo Cruz Rondônia<sup>2</sup> Universidade Federal de Rondônia[iasmin.pimentel@hotmail.com](mailto:iasmin.pimentel@hotmail.com)

A malária é uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e transmitida pela fêmea do mosquito *Anopheles*. Essa doença atinge de 300 a 500 milhões de pessoas por ano no mundo, e dos casos que ocorrem no Brasil, 90% são provenientes da Amazônia, onde grandes empreendimentos, como a construção da Usina Hidrelétrica de Jirau, vêm causando alterações na vegetação e deslocamento da população nas áreas de influência, o que pode levar a alterações na dinâmica de transmissão da malária na região. Dessa forma, o presente trabalho analisou a taxa de infecção de anofelinos por plasmódios na área em questão. Os mosquitos foram capturados de abril de 2011 a junho de 2012, nas margens do rio Madeira, e ao longo da BR, sendo que aproximadamente 30% deles foram analisados nesse estudo. O *Anopheles darlingi* foi o mais abundante (70,2%), seguido do *A. triannulatus* (10,6%), *A. nuneztovari* (6%), *A. konderi* (6%), *A. braziliensis* (5,8%). Para avaliar a taxa de infecção foi realizada a extração de DNA por trituração e aquecimento do tórax dos mosquitos pelo método de NaOH e Tris HCL e amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase – PCR com Taq DNA Polimerase (Invitrogen®) em Nested para *P. vivax* e *P. falciparum*. A taxa de infecção para *Plasmodium* spp. foi semelhante entre as diferentes espécies de anofelinos variando de 3,5 - 4,6%. A taxa de infecção por *P. vivax* foi de 2,9% e por *P. falciparum* 1%, distribuídos uniformemente entre as espécies. Apenas 0,3% dos mosquitos foram positivos para infecção mista apresentada apenas em *A. darlingi* e *A. braziliensis*. A taxa de infecção natural encontrada é semelhante à descrita na literatura por técnicas moleculares.

**Palavras-chave:** *Anopheles*; PCR; Malária**Suporte Financeiro:** FIOCRUZ Rondônia; ESBR

## RESUMO APRESENTADO NO 60º CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA

**Analysis of natural infection by *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* in *Anopheles* spp. (diptera: culicidae) collected in the areas of Jirau hydroelectric power plant in Rondônia**

**Iasmin Ferreira Pimentel <sup>1,2</sup>**

**Alexandre de Almeida e Silva <sup>1,2</sup>**

**Luiz Herman Soares Gil <sup>1</sup>**

**Ricardo de Godoi Mattos Ferreira <sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Fundação Oswaldo Cruz Rondônia

<sup>2</sup> Universidade Federal de Rondônia

[iasmin.pimentel@hotmail.com](mailto:iasmin.pimentel@hotmail.com)

The insect vectors play an important role in the spread of emerging diseases. The family Culicidae has attracted the attention of public health for harboring organisms involved in the transmission of various diseases. Vectors such as *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* and *Anopheles* spp. are responsible for the transmission of important diseases such as filariasis, dengue and malaria, respectively. Anthropogenic processes such as urbanization, buildings and invasion of preserved areas, contribute to the spread of these vectors and possibly affect their breeding, altering the dynamics of disease transmission. The Jirau Power Plant is currently being built on the Madeira river-Rondonia. Control measures have been employed from the start of construction to avoid the spread of diseases, especially malaria, at the areas of influence of the plants on the Madeira river. This study aimed to determine the natural infection by *Plasmodium vivax* and *P. falciparum*, the causative agents of malaria in Brazil, in *Anopheles* species caught at the areas of direct influence of the Jirau powerplant in Rondônia, and to compare the infection rate found among species studied by classical test Z. The collected mosquitoes were identified and referred to the Genetics Laboratory for molecular analysis. DNA extraction by NaOH and TrisHCL, DNA amplification by PCR and visualization of the fragment by electrophoresis was performed. 1872 individual mosquitoes and these were analyzed 78 were positive for *Plasmodium* spp. presenting an infection rate of 4.2 %. The percentage of parasite infection was 2.9 % for *P. vivax*, *P. falciparum* to 1 % and 0.3 % for mixed infection. Among the positive sample, 70.5 % were *P. vivax*, *P. falciparum* 23.1 % and 6.4 % mixed infections. The species of parasitized *Anopheles* found were *Anopheles darlingi*, *An. triannulatus*, *An. nuneztovari*, *An. konderi* and *An. braziliensis*, following the order of the species of *Anopheles* more frequent in the collection. There was no significant difference between the infection rates found among infected *Anopheles* species. Detecting other infected species, besides *An. darlingi*, was an important finding, showing that other species are similar to vector competence of *Anopheles darlingi*, the main vector of the Amazon basin, and may also become potential vectors. Detection of natural infection is one of the main parameters analyzed in the control and monitoring of malaria, it identifies the species of *Anopheles* and *Plasmodium* circulating in the region. The study was part of a report monitoring the construction of the Jirau Power Plant performed by the Laboratory of Entomology IPEPATRO and FIOCRUZ, aiming to assess the dynamics of

transmission and provide entomological support the continuation of the implementation of measures to control malaria in the region.

**Keywords:** *Anopheles* , *Plasmodium* , PCR ,Monitoring, Malaria.

**Financial support:** CAPES, IPEPATRO, FIOCRUZ